

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION  
(PCT Rule 61.2)

Date of mailing:

08 July 1999 (08.07.99)

To:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Crystal Plaza 2  
Washington, DC 20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

International application No.:

PCT/JP98/05864

Applicant's or agent's file reference:

PH-595-PCT

International filing date:

24 December 1998 (24.12.98)

Priority date:

26 December 1997 (26.12.97)

Applicant:

HATTORI, Noriaki et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

28 May 1999 (28.05.99)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election  was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

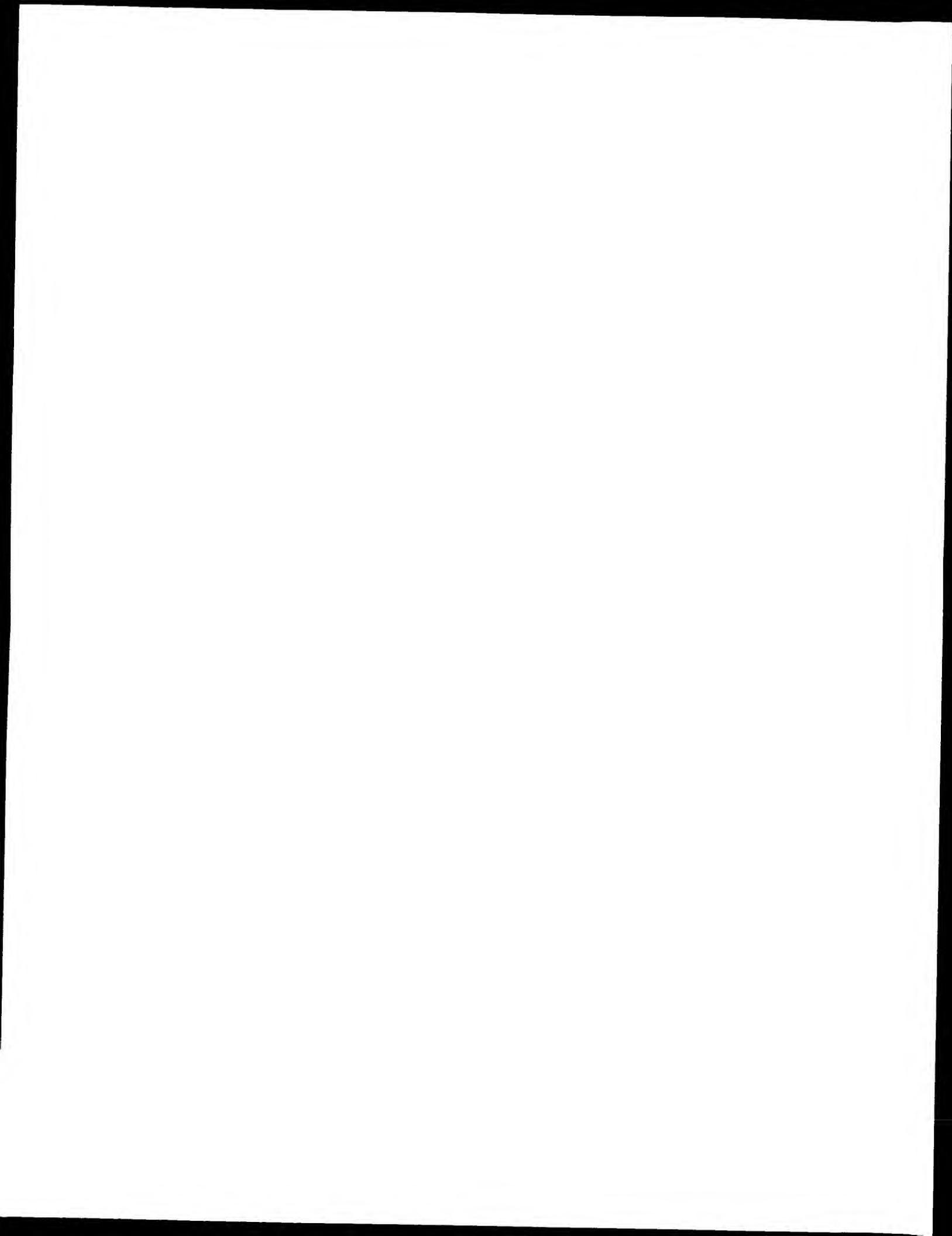
Authorized officer:

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

J. Zahra  
Telephone No.: (41-22) 338.83.38

2708856



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12N 15/53, C12N 9/02, C12N 15/63, C12N 1/21,  
C12Q 1/26

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12N 15/53, C12N 9/02, C12N 15/63, C12N 1/21,  
C12Q 1/26

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG)、JICSTファイル (JOIS)、GeneBank/EMBL/DDBJ  
(GENETYX)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 7-203995, A (東亜電波工業株式会社), 8. 8月. 1995 (08. 08. 95) 全文、第1図 (ファミリーなし)	1, 6-13
Y	JP, 6-504200, A (アマーシャム・インターナショナル・ビーエル シー), 19. 5月. 1994 (19. 05. 94) 全文、第1— 20図 & WO, 92/12253, A1 & EP, 566625, A1 & US, 5558986, A	1, 6-13
Y	W. J. Simpson et al., "The Effect of Detergents on Firefly Luciferase Reactions", Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence, Vol. 6(2), 1991, p. 97-106	1, 6-13
Y	JP, 5-244942, A (キッコーマン株式会社), 24. 9月. 1993 (24. 09. 93) 全文、第1—2図 & EP, 524448, A1 & US, 5229285, A	1, 6-13

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示す  
もの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日  
以後に公表されたもの  
「I」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行  
日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する  
文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって  
て出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理  
論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明  
の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以  
上の文献との、当業者にとって自明である組合せに  
よって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

## 国際調査を完了した日

17. 03. 99

## 国際調査報告の発送日

30.03.99

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

## 特許庁審査官 (権限のある職員)

富士 良宏

印

4 B 8830

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) . 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	JP, 2-171189, A (キッコーマン株式会社), 2. 7月.1990 (02.07.90) 全文、第1-8図 & EP, 353464, B1	1-9
A	Hiroki Tatsumi et al., "Molecular Cloning and Expression in Escherichia Coli of a cDNA Clone Encoding Luciferase of a Firefly, Luciola Lateralis", Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 1131, 1992, p. 161-165	1-9
A	Tsutomu Masuda et al., "Cloning and Sequence Analysis of cDNA for Luciferase of a Japanese Firefly, Luciola Crucifera", Gene, Vol. 77, 1988, p. 265-270	1-9

  
PCT世界知的所有権機関  
国際事務局

## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 C12N 15/53, 9/02, 15/63, 1/21, C12Q 1/26		A1	(11) 国際公開番号 WO99/33997
			(43) 国際公開日 1999年7月8日(08.07.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/05864			
(22) 国際出願日 1998年12月24日(24.12.98)			
(30) 優先権データ 特願平9/361022	1997年12月26日(26.12.97)	JP	(81) 指定国 AU, CA, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書 明細書とは別に規則13の2に基づいて提出された生物材料の寄託に関する表示
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) キッコーマン株式会社 (KIKKOMAN CORPORATION)[JP/JP] 〒278-8601 千葉県野田市野田339番地 Chiba, (JP)			
(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 服部憲晃(HATTORI, Noriaki)[JP/JP] 村上成治(MURAKAMI, Seiji)[JP/JP] 〒278-8601 千葉県野田市野田339番地 キッコーマン株式会社内 Chiba, (JP)			
(74) 代理人 弁理士 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.) 〒105-0001 東京都港区虎ノ門1丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階 Tokyo, (JP)			

(54)Title: LUCIFERASE AND METHOD FOR ASSAYING INTRACELLULAR ATP BY USING THE SAME

(54)発明の名称 ルシフェラーゼおよびそれを用いる細胞内ATPの測定法

## (57) Abstract

A luciferase tolerant to surfactants; and a method for assaying intracellular ATP which comprises the first step of extracting ATP from a cell-containing sample in the presence of a surfactant, the second step of adding a luciferase-containing luminescent reagent to the ATP extract thus inducing luminescence and the third step of detecting the luminescence dose, characterized by using the luciferase tolerant to surfactants.

界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼ、及び細胞を含む試料から界面活性剤の存在下にATPを抽出する第1工程、該ATP抽出液にルシフェラーゼを含む発光試薬を添加して発光させる第2工程、および該発光量を検出する第3工程を含む細胞内ATPの測定法において、ルシフェラーゼとして、界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼを使用することを特徴とする細胞内ATPの測定法。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

A E	アラブ首長国連邦	E S	スペイン	L I	リヒテンシュタイン	S G	シンガポール
A L	アルバニア	F I	フィンランド	L K	スリ・ランカ	S I	スロヴェニア
A M	アルメニア	F R	フランス	L R	リベリア	S K	スロヴァキア
A T	オーストリア	G A	ガボン	L S	レソト	S L	シエラ・レオネ
A U	オーストラリア	G B	英国	L T	リトアニア	S N	セネガル
A Z	アゼルバイジャン	G D	グレナダ	L U	ルクセンブルグ	S Z	スワジランド
B A	ボズニア・ヘルツェゴビナ	G E	グルジア	L V	ラトヴィア	T D	チャード
B B	バルバドス	G H	ガーナ	M C	モナコ	T G	トーゴー
B E	ベルギー	G M	ガンビア	M D	モルドバ	T J	タジキスタン
B F	ブルガリア	G N	ギニア	M G	マダガスカル	T M	トルクメニスタン
B G	ブルガリア	G W	ギニア・ビサオ	M K	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	T R	トルコ
B J	ベナン	G R	ギリシャ	M L	マリ	T T	トリニダッド・トバゴ
B R	ブラジル	H R	クロアチア	M N	モンゴル	U A	ウクライナ
B Y	ベラルーシ	H U	ハンガリー	M R	モーリタニア	U G	ウガンダ
C A	カナダ	I D	インドネシア	M W	マラウイ	U S	米国
C C	中央アフリカ	I E	アイルランド	M X	メキシコ	U Z	ウズベキスタン
C G	コンゴー	I L	イスラエル	N E	ニジェール	V N	ヴィエトナム
C H	イスス	I N	インド	N L	オランダ	Y U	ユーロースラビア
C I	コートジボアール	I S	アイスランド	N O	ノールウェー	Z A	南アフリカ共和国
C M	カムルーン	I T	イタリア	N Z	ニュー・ジーランド	Z W	シンガポール
C N	中国	J P	日本	P L	ポーランド		
C U	キューバ	K E	ケニア	P T	ポルトガル		
C Y	キプロス	K G	キルギスタン	R O	ルーマニア		
C Z	チェコ	K P	北朝鮮	R U	ロシア		
D E	ドイツ	K R	韓国	S D	スウェーデン		
D K	デンマーク	K Z	カザフスタン	S E	スウェーデン		
E E	エストニア	L C	セントルシア				

## 明 細 書

## ルシフェラーゼおよびそれを用いる細胞内 A T P の測定法

## 技術分野

この発明は、界面活性耐性を有する新規ルシフェラーゼおよびそれを用いる細胞内 A T P の測定法に関する。

## 背景技術

食品衛生、バイオ、臨床検査、医学、超純水、環境などの分野では、試料中の細胞の有無や細胞数の計測等を目的として、細胞内 A T P の測定が日常的に行なわれている。細胞内 A T P の測定法においては、細胞を含む試料に、界面活性剤を有効成分とする A T P 抽出試薬を添加して、細胞内 A T P を細胞外に抽出した後、ルシフェラーゼを含む発光試薬を試料に添加し、生じる発光の発光量を測定する方法が一般的である。

ルシフェラーゼは、A T P およびマグネシウムイオンの存在下で、基質であるルシフェリンの発光反応を触媒する酵素である。細胞内 A T P の測定法におけるルシフェラーゼとしては、例えばホタル（ゲンジボタル、ヘイケボタル、アメリカホタル、ロシアホタル等）を由来とするものが用いられている。

細胞内 A T P の抽出は、細胞を含む試料に、A T P 抽出試薬を添加して攪拌することにより成し遂げられる。充分な抽出能力を発現させるためには、試料と抽出試薬を混合したときの混合液に対し、界面活性剤の濃度が0.05%以上になるように添加することが望ましい。しかし、界面活性剤の濃度が0.05%以上である場合、生物発光により A T P 濃度を測定する工程で酵素反応を著しく阻害するため、測定感度および精度が大きく低下する。これは、高濃度の界面活性剤によりルシフェラーゼの活性が低下することが原因であると考えられている。例えば、アメリカホタルのルシフェラーゼは、0.1%の塩化ベンザルコニウムの存在下では、その活性が約20%にまで低下する（第1表参照）。

一方、界面活性剤の濃度が低いと生物発光反応の阻害を小さくできるが、A T

Pの抽出効率が不十分となる。

界面活性剤による発光反応の阻害を抑制する方法として、サイクロデキストリンまたはその誘導体を使用する方法は公知である（特表平6-504200号）。また、細胞を含む試料を界面活性剤と接触させて細胞内ATPを抽出し、次いでルシフェリンールシフェラーゼ生物発光反応法により該ATPを測定する方法において、ATP抽出後の試料をサイクロデキストリンと接触させた後に生物発光反応法を適用することを特徴とする細胞内ATPの測定方法も公知である（特開平7-203995号公報）。

しかしながら、ルシフェラーゼに注目して、界面活性剤による生物発光反応の阻害を抑制しようとした試みはなかった。

従って、発明の目的は、界面活性剤が高濃度に存在する場合でも活性が低下しない、界面活性剤に耐性を有する新規なルシフェラーゼを提供することにある。また、本発明の目的は、界面活性剤を使用して細胞内ATPを抽出し、ついで該細胞内ATPをルシフェラーゼを用いる生物発光反応法により測定する方法において、界面活性剤による生物発光反応の阻害を抑制することができ、且つ細胞内ATPの抽出効率を低下させることがない方法を提供することにある。

なお、ここでいう「抑制」とは、界面活性剤による生物発光反応の阻害を有意に低減すること、及び該阻害を完全に排除することを意味する。

### 発明の開示

本発明は、界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼである。

上記界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼとしては、野生型ホタルルシフェラーゼのアミノ酸配列において、490位のアミノ酸、またはゲンジボタルもしくはヘイケボタルのルシフェラーゼの490位と同等位置のアミノ酸を、グルタミン酸以外の他のアミノ酸、例えばリジンに置換したものが挙げられる。

また、上記界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼとしては、以下の（a）又は（b）からなるポリペプチド

（a）配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド

（b）（a）のポリペプチドにおいて1若しくは複数のアミノ酸が付加、欠失若

しくは置換されたアミノ酸配列からなり、かつ界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼ活性を有するポリペプチド、あるいは以下の(a)又は(b)からなるポリペプチド

(a) 配列番号6で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) (a)のポリペプチドにおいて1若しくは複数のアミノ酸が付加、欠失若しくは置換されたアミノ酸配列からなり、かつ界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼ活性を有するタンパク質、

が挙げられる。

さらに、本発明は上記界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼをコードするルシフェラーゼ遺伝子である。

さらに、本発明は上記界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼをコードするルシフェラーゼ遺伝子を含む組換ベクターである。

さらに、本発明は上記組換ベクターを含む形質転換体である。

さらに、本発明は上記形質転換体を培地に培養し、得られる培養物から界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼを採取することを特徴とする該ルシフェラーゼの製造法である。

さらに、本発明は細胞を含む試料から界面活性剤の存在下にATPを抽出する第1工程、該ATP抽出液にルシフェラーゼを含む発光試薬を添加して発光させる第2工程、および該発光量を検出する第3工程を含む細胞内ATPの測定法において、ルシフェラーゼとして、界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼを使用することを特徴とする細胞内ATPの測定法である。

本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願、平成9年特許願第361022号の明細書及び／または図面に記載される内容を包含する。

### 図面の簡単な説明

第1図は変異型ルシフェラーゼHIKの遺伝子の作製図を示す図であり、第2図は天然型ルシフェラーゼの発光量の経時変化を示す図であり、第3図は変異型ルシフェラーゼの塩化ベンザルコニウムに対する耐性比較を示す図であり、第4図は変異型ルシフェラーゼの塩化ベンゼトニウムに対する耐性比較を示す図である。

## 発明の詳細な説明

以下、本発明について詳述する。

### 〔界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼについて〕

本発明の界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼについて説明する。

「界面活性剤に耐性を有する」とは、次のいずれかの性質を有するものをいう。

(1) 従来公知のルシフェラーゼと比較した場合に、界面活性剤存在下での初発の発光量が増大するものをいう。ここでいう「比較」とは、例えば、公知のルシフェラーゼのアミノ酸配列に変異を導入して本発明のルシフェラーゼを作製する場合であれば、変異導入前のルシフェラーゼの発光量と、変異導入後のルシフェラーゼの発光量との比較を意味する。

(2) 従来公知のルシフェラーゼと比較した場合に、界面活性剤存在下での活性の低下が緩やかであることをいう。

(3) 0.4%の界面活性剤存在下で、85%以上の残存活性を有することをいう。

以後、「界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼ」を、「界面活性剤耐性ルシフェラーゼ」と表記する。

「活性」とは、生物発光反応の触媒活性を意味する。また、本発明でいう「界面活性剤」とは、細胞内ATPの測定系に使用されうるものであればいずれでもよく、例えば、アニオン系界面活性剤、カチオン系界面活性剤、ツイッターアイオン系界面活性剤、非イオン系界面活性剤等が挙げられ、さらに具体的には、塩化ベンザルコニウムあるいは塩化ベンゼトニウム等の第4級アンモニウム塩を主成分とする試薬が挙げられる。

本発明のルシフェラーゼは、発光性生物の発光器官等から調製することにより得られる。発光性生物としては、発光性昆虫、発光性細菌等が挙げられる。発光性昆虫としては、甲虫目(*coleoptera*)に属するもの、例えばホタル科やコメツキムシ科の昆虫、具体的には、ゲンジボタル、ヘイケボタル、アメリカホタル、ロシアホタル、ヒカリコメツキムシツチボタル、鉄道虫等が挙げられる。また、本発明のルシフェラーゼは、上記の発光生物からルシフェラーゼ遺伝子をクローニングし、該遺伝子を適当なベクター宿主系を用いて発現させることにより得ら

れる。

さらに、本発明のルシフェラーゼは、従来公知のルシフェラーゼのアミノ酸配列に付加、欠失、置換等の変異を導入することにより得られる。アミノ酸配列に変異を導入する方法としては、公知の遺伝子工学的手法を使用することができる。その場合、まず、上記の発光性生物を由来とするルシフェラーゼ遺伝子や既知のルシフェラーゼ遺伝子の塩基配列に遺伝子工学的手法により付加、欠失、置換等の変異を導入して変異型ルシフェラーゼ遺伝子を構築する。ついで、該変異型遺伝子を適当なベクター宿主系に導入して組み換え微生物を作製する。さらに該組み換え微生物の中から、本発明のルシフェラーゼを生産するものをスクリーニングし、それを培地に培養し、得られる培養物からルシフェラーゼを採取すればよい。

以後、アミノ酸配列に変異を導入することにより得られた界面活性剤耐性ルシフェラーゼを、「変異型ルシフェラーゼ」と表記することとする。

変異型ルシフェラーゼとしては、例えば、野生型ホタルルシフェラーゼのアミノ酸配列において、ゲンジボタルもしくはヘイケボタルのルシフェラーゼの490位と同等位置のアミノ酸が、グルタミン酸以外のアミノ酸に置換されたルシフェラーゼが挙げられる。グルタミン酸以外のアミノ酸としては、例えば塩基性アミノ酸、具体的には、リジン、アルギニン、ヒスチジン等が挙げられる。「ゲンジボタルもしくはヘイケボタルのルシフェラーゼの490位と同等位置のアミノ酸」とは、確定したルシフェラーゼのアミノ酸配列をゲンジボタルまたはヘイケボタルルシフェラーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、ゲンジボタルまたはヘイケボタルルシフェラーゼの490位のアミノ酸に対応するアミノ酸を意味するものである。

なお、ゲンジボタルまたはヘイケボタルのルシフェラーゼでは、490位のアミノ酸はグルタミン酸である。また、アメリカホタルルシフェラーゼにおいて、「ゲンジボタルまたはヘイケボタルのルシフェラーゼの490位と同等位置のアミノ酸」とは、487位のグルタミン酸である。

さらに具体的には、変異型ルシフェラーゼとは、配列番号1または2で表されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列のうちの1若しくは複数のアミノ酸が付加、

欠失若しくは置換されたアミノ酸配列を含むポリペプチドである。

〔遺伝子工学的手法を用いて変異型ルシフェラーゼを得る方法〕

以下に、遺伝子工学的手法を用いて変異型ルシフェラーゼを得る方法について説明する。

変異型ルシフェラーゼは、既知のルシフェラーゼ遺伝子の塩基配列に付加、欠失、置換等の変異を導入して変異型ルシフェラーゼ遺伝子を構築し、該遺伝子を適当なベクター-宿主系により発現させることにより得られる。

既知のルシフェラーゼ遺伝子としては、特に限定されないが、例えば、ホタルルシフェラーゼ遺伝子、具体的には、野生型ヘイケボタルルシフェラーゼ遺伝子（特開平2-171189号公報に記載）、耐熱性ヘイケボタルルシフェラーゼ遺伝子（特開平5-244942号公報に記載）等が挙げられる。

i) ルシフェラーゼ遺伝子に変異を導入する方法としては、該遺伝子と変異原となる薬剤、具体的にはヒドロキシルアミン、亜硝酸、亜硫酸、5-ブロモウラシル等を接触させる方法を挙げることができる。この他、紫外線照射法、カセツト変異法、PCR法を用いた部位特異的変異導入法等の方法を広く用いることができる。更には、化学合成したDNAをアニーリングして所望の部位に変異を有する変異型ルシフェラーゼ遺伝子を構築することも可能である。

ii) 次いで、変異型ルシフェラーゼ遺伝子を、プロモーター配列、マーカー遺伝子、複製起点等を有するベクターDNAに挿入して組み換え体プラスミドを得る。ベクターDNAは、宿主細胞で複製可能なものであれば如何なるものでもよく、例えば、プラスミドDNA、バクテリオファージDNA等が挙げられる。宿主細胞が大腸菌である場合のベクターDNAとしては、プラスミドpUC119（宝酒造社製）、pBluescript SK+（Stratagene社製）、pMAL-C2（NEW England Labs社製）、pGEX-5X-1（ファルマシア社製）、pXa1（ベーリンガー社製）、pMA56（G. Ammerer, Meth. Enzymol., 101, 192, 1983）等が使用できる。

iii) 次いで、上記の組み換え体プラスミドを用いて適当な宿主細胞を形質転換又は形質導入し、変異型ルシフェラーゼの生産能を有する組み換え微生物をスクリーニングする。

宿主細胞としては、真核細胞及び原核細胞のいずれをも使用できる。真核細胞

としては動物、植物、昆虫、酵母等の細胞が、原核細胞としては大腸菌、枯草菌、放線菌等が挙げられる。動物細胞としては、CHO、COS、HeLa細胞及びミエローマ細胞系統の細胞が、原核細胞としては、エッシェリシア属に属する微生物、例えば大腸菌JM101(ATCC 33876)、JM109(宝酒造社製)、XL1-Blue(Stratagene社製)、HB101(ATCC33694)等が使用できる。

本発明においては、形質転換は、例えば、D. M. Morrisonの方法 (Meth. Enzymol., 68, 326-331, 1979) 等により、形質導入は、例えば、B. Hohnの方法 (Meth. Enzymol., 68, 299-309, 1979) 等により行うことができる。

組み換え微生物より組み換え体DNAを精製する方法としては、例えば、P. Gerryの方法 (J. Bacteriology, 116, 1064-1066, 1973)、D. B. Clewellの方法 (J. Bacteriology, 110, 667-676, 1972) 等を用いることができる。又、組み換え体DNAに挿入された遺伝子の塩基配列の決定は、例えば、Maxam-Gilbert 法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 560-564, 1977)、Dideoxy法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467, 1977) 等により行うことができる。

iv) 上記の方法により得られた組み換え微生物を培地中で培養することにより、本発明の変異型ルシフェラーゼを生産することができる。

宿主細胞が大腸菌である場合、組み換え大腸菌を固体培養法で培養してもよいが、液体培養法により培養するのが好ましい。培地としては、例えば、酵母エキス、トリプトン、ペプトン、肉エキス、コーンスティーピリカーアリイは大豆もしくは小麦ふすま浸出液等の1種以上の窒素源に、塩化ナトリウム、リン酸1カリウム、リン酸2カリウム、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、塩化第2鉄、硫酸第2鉄、あるいは硫酸マンガン等の無機塩類の1種以上を添加し、更に必要により糖質原料、ビタミン等を適宜添加したものが用いられる。なお、培地の初発pHは、pH 7~9に調製するのが適当である。また培養は30~42°C、好ましくは37°C前後で3~24時間、好ましくは5~8時間、通気攪拌深部培養、振とう培養、静置培養等により実施するのが好ましい。

組み換え大腸菌の培養終了後、培養物より変異型ルシフェラーゼを採取するには、通常の酵素採取手段を用いることができる。すなわち、培養物を遠心分離して菌体を得た後、リゾチーム等の酵素を用いた溶菌処理、超音波破碎処理、磨碎

処理等により菌体を破壊し、融合タンパク質を菌体外に排出させる。次いで、ろ過又は遠心分離等を用いて不溶物を除去することにより、変異型ルシフェラーゼを含有する粗酵素液を得ることができる。

本発明では、上記の粗酵素液をそのままタンパク質標品としてもよいが、通常のタンパク質精製法を用いて、更に純度を高めてもよい。具体的には、硫酸安塩析法、有機溶媒沈澱法、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー、電気泳動法等を、単独又は適宜組み合わせて用いることができる。

本発明の界面活性剤耐性ルシフェラーゼを使用することにより、細胞内ATPの抽出工程において、界面活性剤を高濃度に添加することが可能となる。

#### 〔本発明の細胞内ATPの測定法〕

以下に、本発明の細胞内ATPの測定法について説明する。

i) まず、細胞を含む試料に、界面活性剤を有効成分とするATP抽出試薬を添加して、細胞内ATPを細胞外に抽出する。細胞とは、動物、植物、微生物（例えば、酵母、カビ、キノコ、細菌、放線菌、単細胞藻類、ウイルス、原生動物等）等を由来とする細胞を意味する。

試料とは、上記の細胞を含むものであれば特に限定されないが、例えば、飲食物、医薬、化粧品、海水、河川水、工業用水、下水、土壤、尿、糞便、血液、喀痰、膿汁、上記細胞の培養物等が挙げられる。また、上記の試料を、適当な溶媒（例えば、蒸留水、生理的食塩水、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液等）に懸濁した溶液を試料としてもよい。検体液が固形分を含む場合には、該検体液を適当な溶媒に懸濁するか、ミキサーなどでホモジナイズすれば溶液状のものと同様に扱うことができる。

また、上記溶液状の試料を、親水性または疎水性の濾過膜で濾過して細胞を捕捉した後に該濾過膜を試料としてもよい。細胞を捕捉した濾過膜を試料とする場合、親水性濾過膜としては、例えば親水性ポリテトラフルオロエチレン、親水性ポリビニリデンフルオライド、親水性ポリアミド、アセチルセルローズ、ニトロセルローズ等を材料とするフィルム状又はシート状のものが使用できる。また、疎水性濾過膜としては、例えばPVDF（ポリビニリデンフルオライド）、PT

F E (ポリトラフルオロエチレン) 、 P E (ポリエチレン) 等を材料とするものが使用できる。

界面活性剤としては、例えば、アニオン系界面活性剤、カチオン系界面活性剤、ツイッターイオン系界面活性剤、非イオン系性界面活性剤等が挙げられる。アニオン系界面活性剤としては、例えばドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 、ラウリル硫酸カリウム、モノラウロイルリン酸ナトリウム、アルキルベンスルホン酸ナトリウムがあげられる。カチオン系界面活性剤としては、例えば塩化ベンザルコニウム (BAC) 、塩化ベンゼトニウム (BZC) 、塩化セチルピリジニウム、臭化セチルトリメチルアノニウム、塩化ミリスチルジメチルベンジルアンモニウムがあげられる。また、ツイッターイオン系界面活性剤としては、例えばTwittergent Detergent 3-08, 3-10, 3-12, 3-14, 3-16、Tegoがあげられる。さらに非イオン性界面活性剤、例えば、Tween 20, 60, 80、Span 60, 80、Triton X-45, x-100、ポリオキシエチレンエーテル、ポリオキシエチレンラウリルエーテルがあげられる。

界面活性剤の濃度は、充分なATP抽出能力を発現させる濃度であればいずれでもよいが、試料とATP抽出試薬を混合した時の混合液に対し、界面活性剤の濃度が好ましくは0.05%以上になるように添加する。

試料とATP抽出試薬との反応条件は、室温あるいは加温しつつ接触させればよい。

ii) ATP抽出後の試料に界面活性剤耐性ルシフェラーゼを含む生物発光試薬を添加して発光を生じさせ、生じた発光を検出する。

界面活性剤耐性ルシフェラーゼがホタル由来のものである場合、生物発光試薬とは、例えば以下の (イ) ~ (ハ) の成分を含む試薬である。

- (イ) 界面活性剤耐性ルシフェラーゼ
- (ロ) ルシフェリン
- (ハ) マグネシウムイオンまたは他の金属イオン

なお、発光試薬には上記の成分のほか、pH調製や保存性向上に関する物質を添加してもよい。そのような物質としては、例えば、EDTA 2Na、ジチオスレイトル、硫酸アンモニウム、シュークロース、2-メルカプトエタノール、HEPES

、Tricine、Tris、等が挙げられる。

iii) 生物発光試薬の添加により生じた光の発光量は、ルミノメーター、例えばキッコーマン社製ルミテスターK-100、アロカ社製ルミネッセンスリーダーBLR-201（改良型）、ベルトールド社製Lumat LB9501等により測定することができる。また、細胞を捕捉した濾過膜を試料とする場合、生物発光画像解析システム装置、例えばARGUS-50/CL〔テープファイバー付：浜松ホトニクス（株）社製〕を用いて濾過膜上の輝点を撮像することにより、細胞数を測定することが可能である。

以下に、実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。ただし、本発明はこれらの実施例にそのその技術的範囲が限定されるものではない。

〔実施例1〕 各種ホタル由来の天然型ルシフェラーゼの界面活性剤耐性  
(各種ホタル由来の野生型ルシフェラーゼの調製法)

以下の方法に準じて、ゲンジおよびヘイケボタル由来のルシフェラーゼを調製した。すなわち、25mMトリス（ヒドロキシ）アミノメタン-塩酸緩衝液に、1mMエチレンジアミン4酢酸2ナトリウム及び2mMフェニルメチルスルフォニルフルオリドを添加し、更に硫酸アンモニウムを10%飽和となる如く添加して得た混液（pH7.8）に、各種ホタルの尾部を添加してヒスコトロン〔（株）日音医理器械製作所製〕を用いて破壊した。得られた溶液を12,000r. p. m. で20分間遠心分離し、上清を以下の精製工程の出発原料とした。精製は、硫酸アンモニウム塩析、ウルトロゲル（Ultrogel）AcA34（LKB社製）カラム、ヒドロキシーアパタイトHPLC（東洋曹達工業社製、TSKgel HA-1000）カラムの工程により行い、最終的に電気泳動的に单一な標品を得た。なお、アメリカホタル由来のルシフェラーゼは市販品（Sigma社製、L-9506）を使用した。

（ルシフェラーゼの活性測定法）

ルシフェラーゼ標品を酵素希釈液（1 mM EDTA, 1 mM 2-メルカプトエタノール, 1% BSA, 50 mM HEPES, (pH 7.5)）にて適宜希釈し、その100 μl に100 μl の基質溶液（1.4 mMルシフェリン, 40 mM ATP, 300 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 50 mM HEPES, (pH 7.5)）を添加した。発光量の測定は、BLR-201 Luminescence reader（アロカ社製）を用いて以下の設定条件で測定を行った。

測定レンジ : x100

表示数値 : x1000

測定温度 : 30°C

測定時間 : 20秒間

この条件での測定値が1 Kcountの時の活性値を1 MLU (メガライトユニット) /mlとした。

#### (界面活性剤耐性の測定法)

各種ホタル由来ルシフェラーゼ標品を0.5 MLU/mlの濃度になるよう酵素希釈液 (1 mM EDTA, 1 mM 2-メルカプトエタノール, 5%グリセロール, 50 mM HEPES (pH 7.5)) を用いて調整し、酵素標品とした。

100 μl の基質溶液 (4 mM ATP, 0.4 mM ルシフェリン, 10 mM 硫酸マグネシウム, 50 mM HEPES (pH 7.5)) に50 μl の0.4%塩化ベンザルコニウム (25 mM Tricine (pH 7.75)) を添加し、さらに50 μl の酵素標品を添加して、5秒攪拌した後にBerthold Lumat LB-9501にて1秒ごとに1分間の発光量を経時的に測定した。

その結果を図2に示す。図中縦軸には、0.4%塩化ベンザルコニウムの代わりに25 mM Tricine (pH 7.75)を使用したときの初発発光量を100%とした際の発光量の相対比をプロットしている。

この結果において、アメリカホタルルシフェラーゼは初発の発光量が低く、また発光量が急激に減衰しているのがわかる。これはアメリカホタルルシフェラーゼの界面活性剤耐性が低いためであり、感度の低下および測定値の精度の低下を招く。これに対し、ゲンジボタルルシフェラーゼはアメリカホタルルシフェラーゼと比べ初発の発光量が高かった。すなわち、ゲンジボタルルシフェラーゼはアメリカホタルルシフェラーゼより界面活性剤耐性が優れていることが示された。さらにヘイケボタルルシフェラーゼはゲンジボタルルシフェラーゼより初発の発光量が高く、発光の減衰も緩やかであったことから、優れた耐性を示すことが明らかになった。この結果より、ルシフェラーゼの界面活性剤に対する耐性度は、起源とするホタルの種類により異なっていることが示唆された。

#### [実施例2] 変異型ルシフェラーゼHLKおよびHIKの作製

以下の方法により、ヘイケボタルを由来とする2種類の変異型ルシフェラーゼ

(「HLK」及び「HIK」と命名)を調製した。

(変異型ルシフェラーゼHLKをコードする遺伝子の作製)

PCRを用いた部位特異的変異法により、変異型ルシフェラーゼ遺伝子を作成した。PCR反応の録型として特開平5-244942号公報記載のプラスミドpHLf7-217Leu(プラスミドpUC119に、217番目のAlaに相当する遺伝子部分がLeuをコードする遺伝子に置換された耐熱性ヘイケボタルルシフェラーゼの遺伝子が挿入された組み換え体プラスミド)を使用した。なお、該プラスミドが導入された大腸菌JM101株は、大腸菌(E. coli) JM101(pHLf7-217Leu)と命名され、工業技術院生命工学工業技術研究所(茨城県つくば市東1丁目1番3号)にFERM BP-3840(寄託日:平成4年(1992)4月22日)として寄託されている。

PCR反応のプライマーとして配列番号1、2で表される塩基配列のオリゴヌクレオチドを、またDNA polymeraseとしてのKOD dash polymerase( TOYOB0社製)を使用した。KOD dash polymeraseに付属の実施例に準じてGeneAmp PCR System 9600(Perkin Elmer社製)を用い、94°Cで30秒、50°Cで2秒、74°Cで3分のサイクルを30サイクル繰り返し、PCR反応を行った。生じたPCR産物を常法に従ってLigationを行い、環状の組み換え体プラスミドpHLfLKを得た。

pHLfLKに含まれる変異型ルシフェラーゼ遺伝子のシークエンシングを行った。ダイプライマータックシークエンシングキット(アプライドバイオシステムズ社製)を用いて反応を行い、ABI 373A DNAシークエンサー(アプライドバイオシステムズ社製)で泳動解析を行った。このようにして得られた変異型ルシフェラーゼ遺伝子の全塩基配列を配列番号3に、また、該遺伝子がコードするポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号4に示す。変異型ルシフェラーゼ遺伝子では、野型ヘイケボタルルシフェラーゼの217番目のアラニンに相当する遺伝子部分がロイシンに、また490番目のグルタミン酸に相当する遺伝子部分がリジンをコードする遺伝子に置換されていた。

pHLfLKを導入した大腸菌JM109株を、大腸菌(E. coli) JM109(pHLfLK)と命名した(図1参照)。大腸菌(E. coli) JM109(pHLfLK)は、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-6147(寄託日:平成9年(1997)10月16日)として寄託されている。

配列番号4に示すポリペプチドを、変異型ルシフェラーゼHLKと命名した。  
(変異型ルシフェラーゼHIKをコードする遺伝子の作製)

特開平5-244942号公報記載のプラスミドpHLf7-217Ile (プラスミドpUC119に、217番目のAlaに相当する遺伝子部分がIleをコードする遺伝子に置換された耐熱性ヘイケボタルルシフェラーゼの遺伝子が挿入された組み換え体プラスミド)を用いて変異型ルシフェラーゼ遺伝子を作成した。該プラスミドによる形質転換株は、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-3841 (寄託日: 平成4年(1992)4月22日)として寄託されている。

pHLfLKをEcoRVおよびNarIで切断し得られた約560bpの断片をアガロースゲル電気泳動により取得し、同じ制限酵素で処理したpHLf7-217Ileに挿入した。

このようにして得られた組み換え体プラスミドをpHLfIKと命名し、該プラスミドを導入した大腸菌JM109株を大腸菌 (E. coli) JM109(pHLfIK)と命名した。大腸菌 (E. coli) JM109(pHLfIK)は、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-6146 (寄託日: 平成9年(1997)10月16日)として寄託されている。

pHLfIKに含まれる変異型ルシフェラーゼ遺伝子の全塩基配列を配列番号5に、また、該遺伝子がコードするポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号6に示す。変異型ルシフェラーゼ遺伝子では、野性型ヘイケボタルルシフェラーゼの217番目のアラニンに相当する遺伝子部分がイソロイシンに、また490番目のグルタミン酸に相当する遺伝子部分がリジンをコードする遺伝子に置換されていた(図1参照)。

配列番号6に示すポリペプチドを、変異型ルシフェラーゼHIKと命名した。

### 〔実施例3〕 変異型ルシフェラーゼHLKおよびHIKの調製

大腸菌 (E. coli) JM109(pHLfLK)及び大腸菌 (E. coli) JM109(pHLfIK)を、それぞれアンピシリンを含むLB培地 [バクトトリプトン1% (W/V)、酵母エキス0.5% (W/V)、NaCl 0.5% (W/V)、アンピシリン (50  $\mu$ g/ml)、1.4% (W/V) 寒天]に接種し、37°Cで18時間培養を行なった。得られた培養液を、8000 r.p.m.で10分間の遠心分離し、沈殿した菌体を0.1Mリン酸カリウム緩衝液 (pH7.8)、0.1M硫酸アンモニウム、1mM EDTA]に懸濁した後、超音波破碎した。

次いで、12000 r. p. m. で10分間遠心分離を行ない、粗酵素液を得た。得られた粗酵素液を前述した精製法により、電気泳動的に単一にまで精製した。

〔実施例4〕 変異型ルシフェラーゼHLKおよびHIKの界面活性剤耐性  
(発光の経時変化)

変異型ルシフェラーゼと公知のルシフェラーゼとの界面活性剤耐性を比較するため、前述した界面活性剤耐性の測定法に準じて発光量の経時変化を測定した。界面活性剤として、0.4% 塩化ベンザルコニウム(25mM Tricine(pH 7.75)) を使用した結果を図3に、0.8% 塩化ベンゼトニウム(25mM Tricine(pH 7.75)) を使用した結果を図4に示す。

図中「ヘイケI変異体」は、野性型ヘイケボタルルシフェラーゼの217番目のAlaがIleに置換された耐熱性ヘイケボタルルシフェラーゼ(特開平5-244942号公報)であり、「ヘイケL変異体」は、野性型ヘイケボタルルシフェラーゼの217番目のAlaがLeuに置換された耐熱性ヘイケボタルルシフェラーゼ(特開平5-244942号)である。また、「HIK」はヘイケI変異体の490番目のGluをLysに置換した変異体であり、実施例3で調製した変異型ルシフェラーゼHIKである。「HLK」はヘイケL変異体の490番目のGluをLysに置換した変異体であり、実施例3で調製した変異型ルシフェラーゼHLKである。

図3に示した塩化ベンザルコニウムの結果において、HIKとヘイケI変異体とを比較するとHIKのほうが発光の減衰が穏やかであることがわかる。また、HLKとヘイケL変異体とを比較すると、HLKのほうが初発発光量が20%程度向上しており、また発光の減衰が穏やかであることがわかる。このことより490番目のアミノ酸の置換により界面活性剤耐性が向上していることが示された。

図4に示した塩化ベンゼトニウムの結果において、HIKとヘイケI変異体とを比較すると、HIKのほうが発光の減衰が穏やかであることがわかる。また、HLKとヘイケL変異体とを比較すると、HLKのほうが発光の減衰が穏やかであることがわかる。このことより490番目のアミノ酸の置換により界面活性剤耐性が向上していることが示された。

(発光率の比較)

発光の経時変化を測定する際に使用した酵素溶液、基質溶液および塩化ベンザ

ルコニウムを用い、実際の発光測定条件下での測定値への影響を調べた。Berthold Lumat LB-9501を用い、待ち時間5秒、測定時間3秒の測定条件で求めた発光量を第1表に示す。なお、0.4%塩化ベンザルコニウムの代わりに25 mM Tricine (pH 7.75)を使用したときの発光量をコントロールとし、0.4%塩化ベンザルコニウム存在時の発光量をコントロール値で割った値を発光率(残存活性)として算出した。

第1表 各種ルシフェラーゼの発光率

ルシフェラーゼの種類	発光量 (RLU)		発光率 (%)
	抽出試薬なし	抽出試薬あり	
アメリカボタルルシフェラーゼ	452563	97790	21.6
ゲンジボタルルシフェラーゼ	409406	167805	41.0
ハイケボタルルシフェラーゼ	425792	324724	76.3
ハイケ変異体	422269	341039	80.8
ハイケL変異体	423728	343634	81.1
HIK	386429	345159	89.3
HLK	390289	396764	101.7

アメリカボタルルシフェラーゼは発光率が21.6%と最も低く、感度が大幅に低下することが示唆された。これに対しゲンジボタルルシフェラーゼおよびハイケボタルルシフェラーゼの発光率はそれぞれ41.0%および76.3%であり、アメリカボタルルシフェラーゼと比較し感度低下の影響が少ないことがわかる。

一方、変異型ルシフェラーゼHIKおよびHLKの発光率はそれぞれ89.3%および101.7%であり、野性型のハイケボタルルシフェラーゼおよび耐熱性ハイケボタルルシフェラーゼの発光率を大きく上回った。中でもHLKの発光率はほぼ100%であり、界面活性剤の有無にかかわらず同じ発光量を得ることが出来る。すなわち界面活性剤を用いても感度低下を全く受けず、精度の高い測定が可能であることが示された。

(IC50の比較)

塩化ベンザルコニウムと各種ルシフェラーゼを10分間接触させ、活性の50%を失活させる塩化ベンザルコニウム濃度（IC50）を求めた。前述した濃度に調整したルシフェラーゼ溶液と0.01～0.1%までの塩化ベンザルコニウムを等量で混和し、10分間室温で放置した。その後、100  $\mu$  l の基質溶液を添加して、Berthold Lumat LB-9501にて直ちに発光量を測定した。得られたIC50を第2表にまとめた。

第2表 各種ルシフェラーゼのIC<sub>50</sub>

ルシフェラーゼの種類	IC <sub>50</sub> (%)
アメリカホタルルシフェラーゼ	0.014
ケンブホタルルシフェラーゼ	0.016
ハイケホタルルシフェラーゼ	0.026
-----	
ハイケI変異体	0.028
ハイケL変異体	0.028
HIK	0.032
HLK	0.035

野性型ルシフェラーゼ3種のうちアメリカホタルルシフェラーゼは最も低いIC50を示し、界面活性剤に対する耐性が最も劣っていることが示された。ハイケボタルルシフェラーゼは野性型の中で最も高いIC50を示した。HLKおよびHIKは、野性型ハイケボタルルシフェラーゼおよび耐熱性ハイケボタルルシフェラーゼのIC50を更に上回り、490番目のアミノ酸の置換により耐性が向上したことが示された。中でもHLKのIC50はHIKを上回り、最も界面活性剤耐性が優れていることが示唆された。

〔実施例5〕 (細胞内ATPの測定法)

次に、本発明の界面活性剤耐性ルシフェラーゼを用いた細胞内ATPの測定法について説明する。

なお、従来法として、トリクロロ酢酸 (TCA)により細胞内ATPを抽出し、抽出されたATP量をルシフェリンールシフェラーゼ発光反応により測定する方法 (TC

A 抽出法) を採用した。TCA 抽出法はATP の抽出効率が非常に優れており、また、TCA を含む試料を 100 倍に希釈した後に発光を測定するので、TCA による発光反応の阻害も生じない。しかし、この希釈操作のため、TCA 抽出法は、操作が煩雑となり、また、測定感度の低下が起こるという問題がある。

## 1. 実験材料

### (1) 使用した界面活性剤

界面活性剤として、塩化ベンザルコニウム (BAC、日本薬局法のオスバン液) を使用した。上記界面活性剤を 0.25 % 濃度で 25mM Tricine (pH 7.75) に溶解したものを、ATP抽出用試薬とした。

### (2) 使用した微生物

*Escherichia coli* (ATCC 25922)、*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)、*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) および *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) の 4 菌種を使用した。

### (3) 試料の調製

従来法では、上記微生物を普通ブイヨン培地 (栄研化学(株) 製) で一晩 35 °C で培養して得られた培養液の原液を試料とした。一方、本発明の方法では、該培養液の原液を滅菌水で 100 倍希釈して得られた希釈液を試料とした。

### (4) 使用したルシフェラーゼ

本発明の界面活性剤耐性ルシフェラーゼとして、HIK 及び HLK を使用した。また、対照として公知のルシフェラーゼ種 (アメリカボタルルシフェラーゼ、ゲンジボタルルシフェラーゼ、ヘイケボタルルシフェラーゼ、ヘイケ I 変異体、ヘイケ L 変異体) を使用した。

### (5) 発光試薬

各種ルシフェラーゼを、0.15 mM ルシフェリン、6 mM EDTA、15 mM 酢酸マグネシウム、0.2 mM ジチオスレイトール、0.5 % BSA、25 mM HEPES (pH 7.75) の溶液に添加し、発光試薬として用いた。

添加するルシフェラーゼ量は、発光試薬 100 μl に等量の  $2 \times 10^{-8}$  M の ATP 標準液を添加した時の発光量が、発光試薬として「ルシフェラーゼ LU」(キッコーマン社製) に付属の発光試薬を用いた時と同じになるように調整した。

## 2. 細胞内 A T P の測定法について

## (1) 本発明の方法

試料100  $\mu$ lにATP抽出用試薬100  $\mu$ lを添加した。20秒間室温で放置した後、発光試薬100  $\mu$ lを添加し、直ちに発光量をBerthold社製Lumat LB-9501 を用いて測定した。

## (2) 従来法

試料100  $\mu$ lに等量の10%のトリクロロ酢酸溶液を加えて1分間放置した。その抽出液に9.8 ml の25mM Tricine(pH 7.75)を添加してよく攪拌した。この試料100  $\mu$ lに100  $\mu$ l の25mM Tricine(pH 7.75)および「ルシフェール LU」(キッコーマン社製)に付属の発光試薬100  $\mu$ lを添加し、直ちに発光量をBerthold社製Lumat LB-9501 を用いて測定した。

## 3. 結果

結果を第3表及び第4表に示す。また、従来法(TCA抽出法)で得られた発光量を100%とした際に、各種ルシフェラーゼを用いた発光試薬で得られた発光量の相対比も表中に示した。

第3表 細胞内 A T P の測定

測定法	E.coli ATCC 25922		S.aureus ATCC 25923	
	測定値 (RLU)	相対比 (%)	測定値 (RLU)	相対比 (%)
従来法 (TCA抽出法)	132794	(100.0)	130220	(100.0)
アリカホタルルシフェラーゼ	153	(0.1)	163	(0.1)
ゲンジホタルルシフェラーゼ	463	(0.3)	659	(0.5)
ヘイケホタルルシフェラーゼ	76082	(57.3)	74019	(56.8)
ヘイケI変異体	47655	(35.9)	50031	(38.4)
ヘイケII変異体	46217	(34.8)	51243	(39.4)
HIK	97073	(73.1)	76533	(58.8)
HLK	87981	(66.3)	72182	(55.4)

第4表 細胞内ATPの測定

測定法	P.aeruginosa ATCC 27853		E.faecalis ATCC 29212	
	測定値 (RLU)	相対比 (%)	測定値 (RLU)	相対比 (%)
従来法 (TCA抽出法)	168141	(100.0)	12427	(100.0)
アメリカボタルルシフェラーゼ	553	(0.3)	113	(0.1)
ゲンジボタルルシフェラーゼ	1503	(0.9)	163	(1.3)
ヘイケボタルルシフェラーゼ	117096	(69.6)	8132	(65.4)
ヘイケI変異体	80455	(47.8)	4586	(36.9)
ヘイケL変異体	81069	(48.2)	4762	(38.3)
HIK	131134	(78.0)	7914	(63.7)
HLK	131815	(78.4)	7998	(64.4)

アメリカボタルルシフェラーゼを用いた発光試薬は全く発光せず、またゲンジボタルルシフェラーゼの場合も微弱な発光しか示さなかった。これは、ルシフェラーゼ自体が界面活性剤により失活してしまったためである。従って、これらのルシフェラーゼには、ATP抽出用試薬として本検討で用いたような高濃度の界面活性剤は使用出来ないことが示された。

一方、ヘイケボタルルシフェラーゼの場合、アメリカボタルルシフェラーゼやゲンジボタルルシフェラーゼと異なり、TCA抽出法の6～7割程度の発光が認められた。ヘイケボタルルシフェラーゼは、アメリカボタルルシフェラーゼやゲンジボタルルシフェラーゼより高い界面活性剤耐性を有することが示された。

耐熱性ヘイケボタルルシフェラーゼであるヘイケI変異体およびヘイケL変異体の場合、得られた発光量はTCA抽出法の4割前後であり、野性型のヘイケボタルルシフェラーゼの場合を大きく下回った。

ところで、本発明の界面活性剤耐性ルシフェラーゼ、すなわちHIK及びHLKの場合、得られた発光量は野性型ヘイケボタルルシフェラーゼ及び耐熱性ルシフェラーゼを上回るものであった。また、この場合の発光量は、TCA抽出法の6～8割であった。

H I K 及び H L K は、ヘイケ I 変異体およびヘイケ L 変異体の490位のGlu を Lys に置換したものである。490位のアミノ酸への変異の導入により、界面活性剤に対する耐性が向上したものと考えられる。従って、H I K 及び H L K は、本検討で用いたような高濃度のATP 抽出用試薬に対しても感度低下は少ないので、これらを用いることにより、精度の高い測定が可能であることが示された。

#### 産業上の利用可能性

本発明にかかる界面活性剤に耐性を有する新規なルシフェラーゼは、それを用いて細胞内 A T P を測定することにより界面活性剤が高濃度に存在する場合でもルシフェラーゼ活性が低下することなく細胞内 A T P を測定することができる。

本明細書で引用する全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書に取り入れるものとする。

#### 配列表フリーテキスト

配列番号 1 : 合成 D N A

配列番号 2 : 合成 D N A

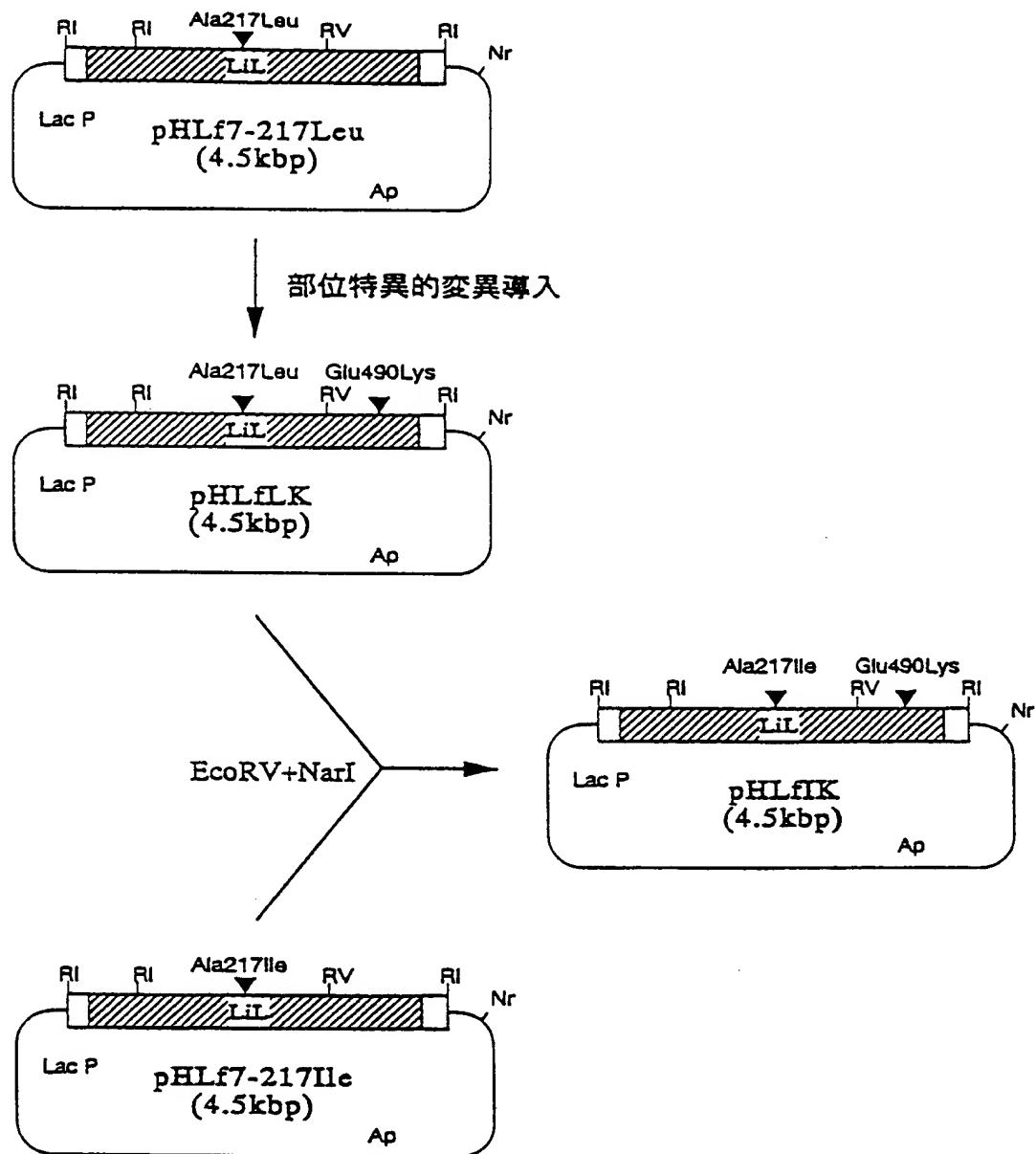
## 請 求 の 範 囲

1. 界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼ。
2. ホタルルシフェラーゼのアミノ酸配列において、ゲンジボタルもしくはヘイケボタルのルシフェラーゼの490位と同等位置のアミノ酸が、グルタミン酸以外の他のアミノ酸に置換されたものである、請求の範囲第1項記載のルシフェラーゼ。
3. グルタミン酸以外の他のアミノ酸がリジンである、請求の範囲第2項記載のルシフェラーゼ。
4. 以下の(a)又は(b)からなる請求の範囲第1項記載のルシフェラーゼ。
  - (a) 配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド
  - (b) (a)のポリペプチドのアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が付加、欠失若しくは置換されたアミノ酸配列からなり、かつ界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼ活性を有するポリペプチド
5. 以下の(a)又は(b)からなる請求の範囲第1項記載のルシフェラーゼ。
  - (a) 配列番号6で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド
  - (b) (a)のポリペプチドにおいて1若しくは複数のアミノ酸が付加、欠失若しくは置換されたアミノ酸配列からなり、かつ界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼ活性を有するポリペプチド
6. 請求の範囲第1項乃至第5項のいずれかの項記載のルシフェラーゼをコードする、ルシフェラーゼ遺伝子。
7. 請求の範囲第6項記載のルシフェラーゼ遺伝子を含む組換ベクター。
8. 請求の範囲第7項記載の組換ベクターを含む形質転換体。
9. 請求の範囲第8項記載の形質転換体を培地に培養し、得られる培養物からルシフェラーゼを採取することを特徴とするルシフェラーゼの製造法。
10. 細胞を含む試料から界面活性剤の存在下にATPを抽出する第1工程、該ATP抽出液にルシフェラーゼを含む発光試薬を添加して発光させる第2工程および該発光量を検出する第3工程を含む細胞内ATPの測定法において、ル

シフェラーゼとして、界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼを使用することを特徴とする細胞内 A T P の測定法。

- 1 1. 界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼが請求項 1 乃至 5 のいずれかの項記載のルシフェラーゼであることを特徴とする、請求の範囲第 1 0 項記載の細胞内 A T P の測定法。
- 1 2. 発光試薬の添加による発光が、0.01%以上の界面活性剤の存在下で行なわれる請求の範囲第 1 0 項または第 1 1 項に記載の細胞内 A T P の測定法。
- 1 3. 界面活性剤がカチオン系界面活性剤、アニオン系界面活性剤、非イオン系界面活性剤、ツイッターアイオン系界面活性剤のいずれかである請求の範囲第 1 0 項、第 1 1 項または第 1 2 項に記載の細胞内 A T P の測定法。

## 図 1



LL; *Luciola lateralis* ルシフェラーゼ cDNA、Ap;  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子、LacP;  $\beta$ -ガラクトトシダーゼ プロモーター、RI; EcoRI、RV; EcoRV、Nr; NarI

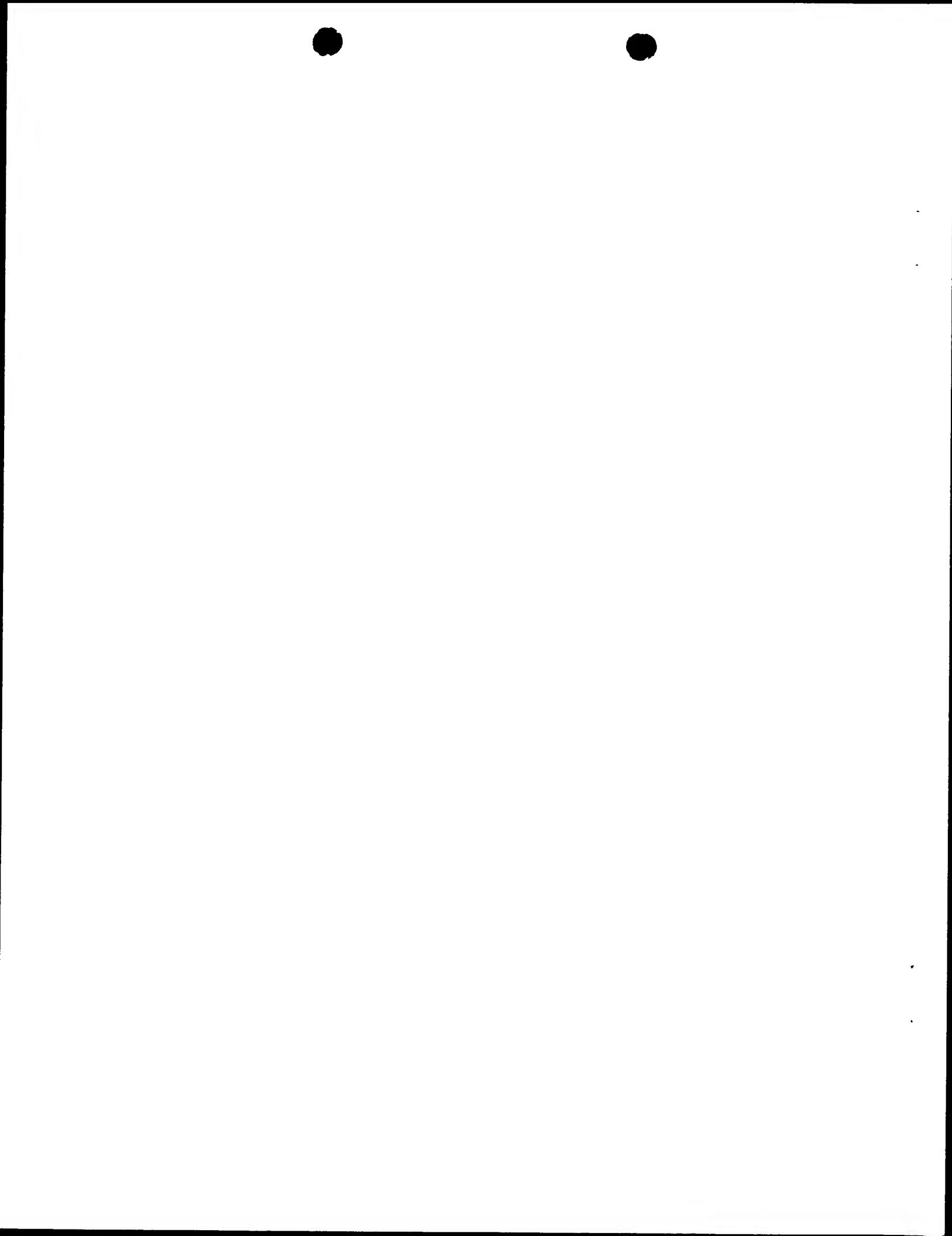
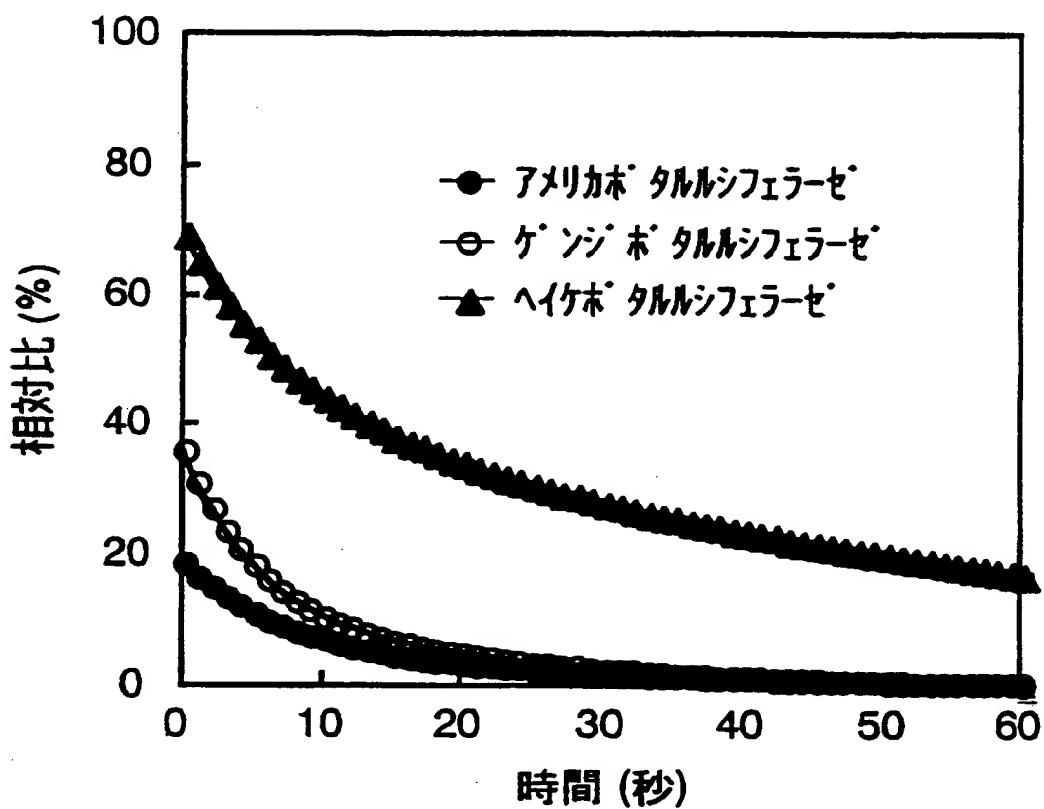


図 2



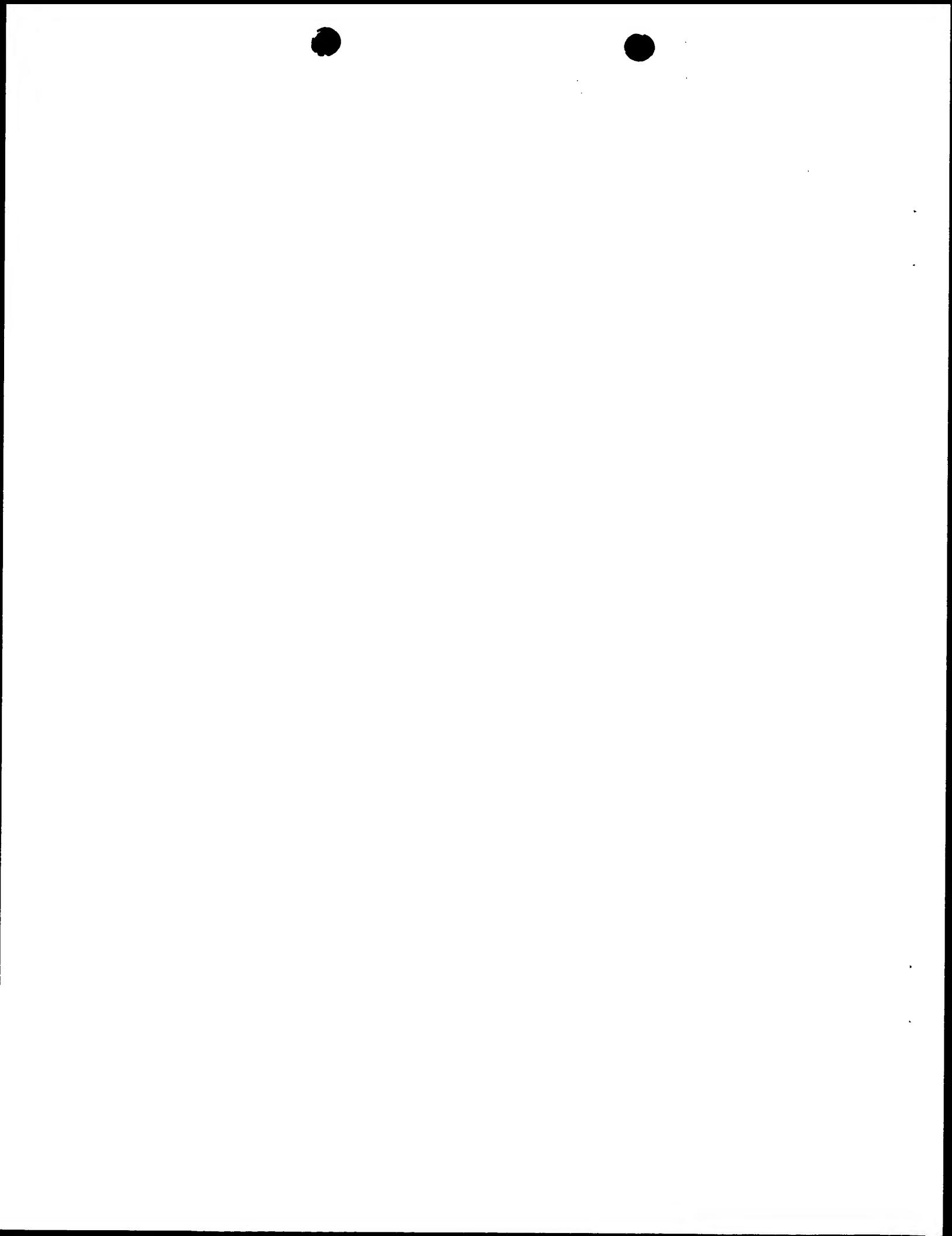


図 3

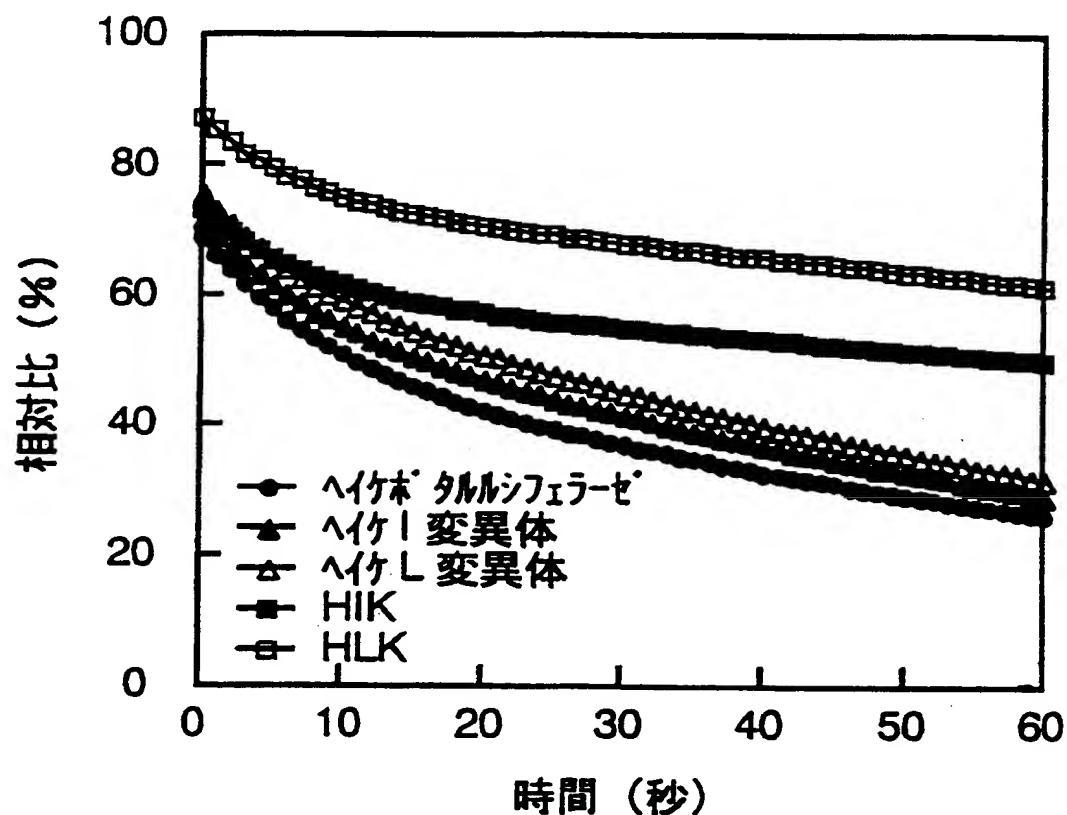
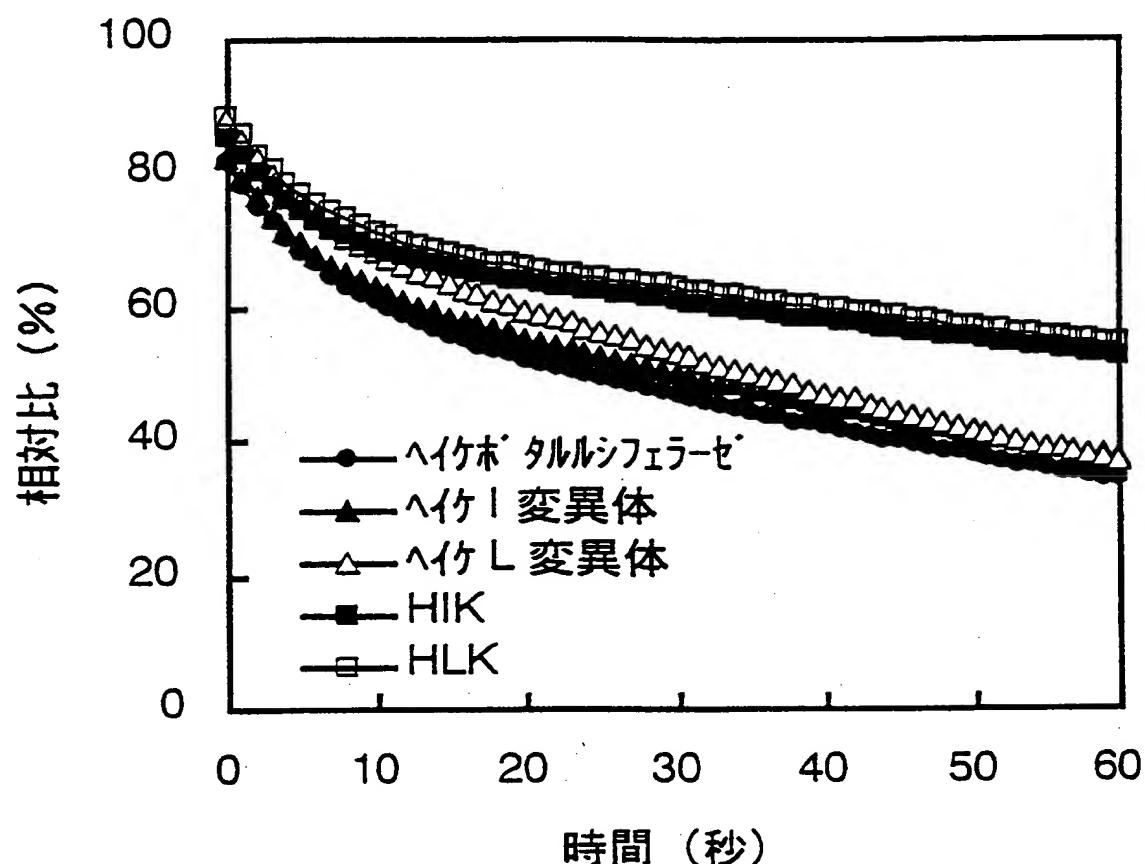
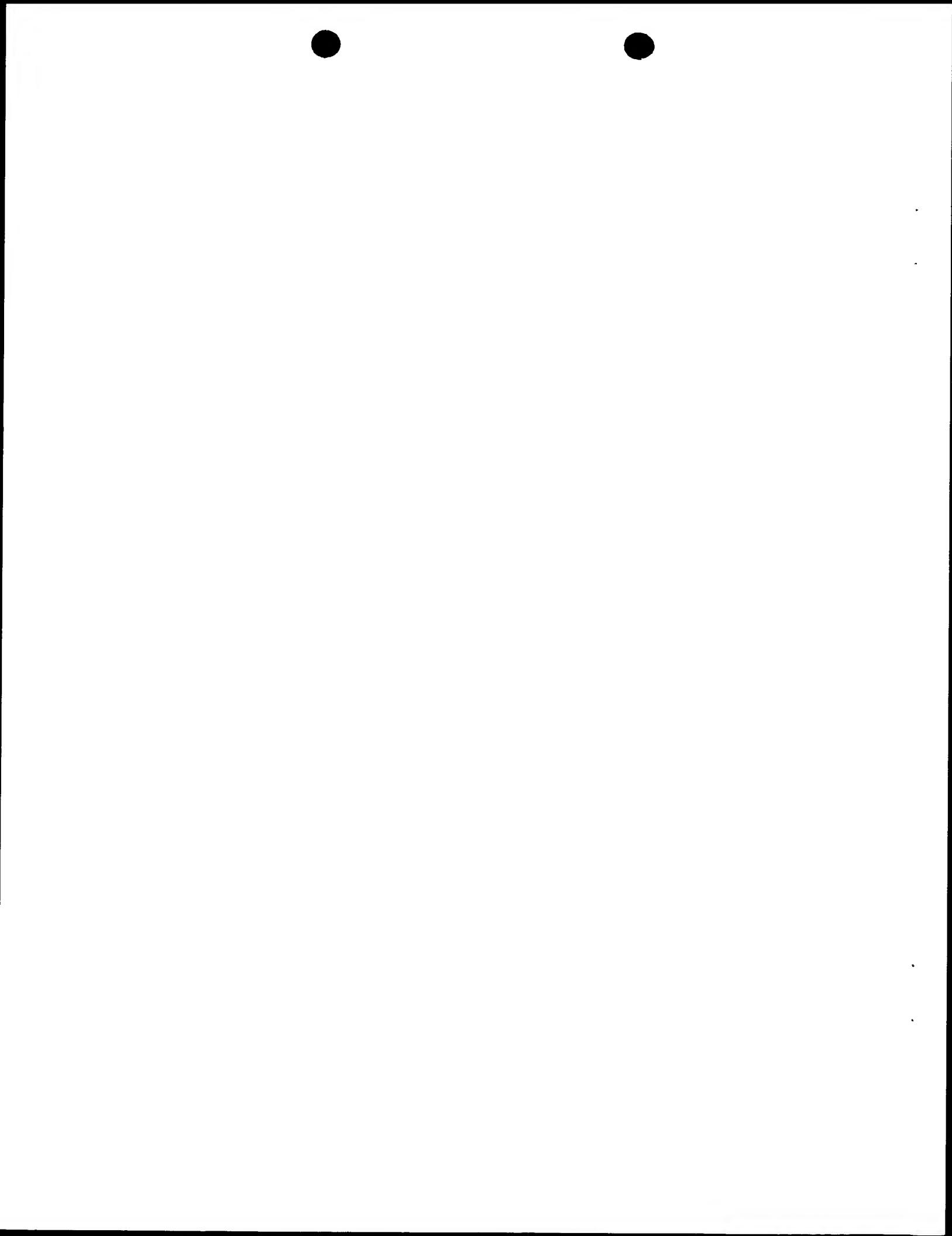




図 4





## 配列表

## SEQUENCE LISTING

<110> KIKKOMAN CORPORATION

<120> LUCIFERASE AND A METHOD FOR DETECTING INTRACELLULAR ATP  
USING THE SAME

<130> P98-0634

<140>

<141>

<150> JP97/361022

<151> 1997-12-26

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

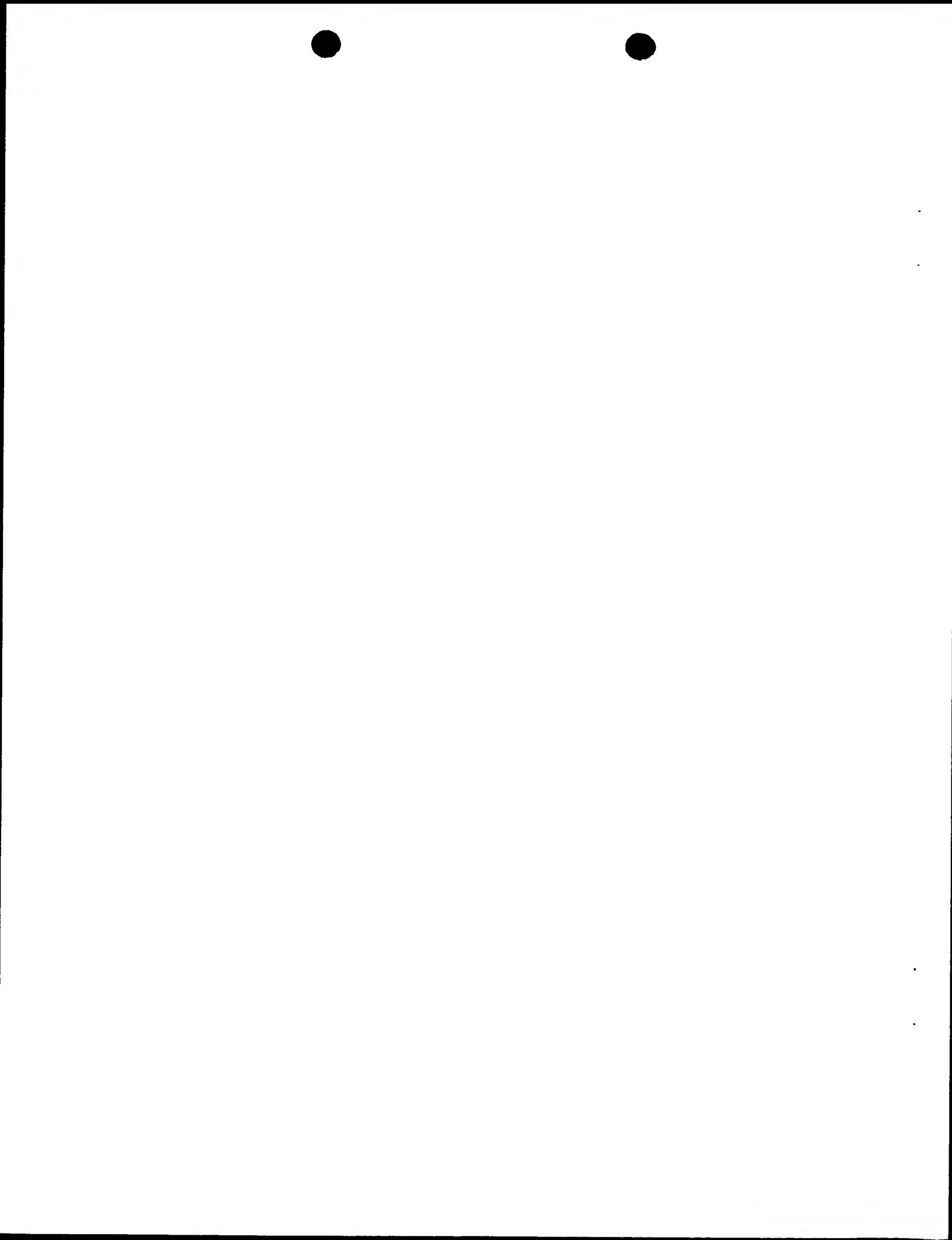
<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA



<400> 1

tgttgtactt aagaaaggaa aat

23

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 2

acagctcccg gaagctcacc agc

23

<210> 3

<211> 1644

<212> DNA

<213> *Luciola lateralis*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1644)

<400> 3

atg gaa aac atg gag aac gat gaa aat att gtg tat ggt cct gaa cca 48

Met Glu Asn Met Glu Asn Asp Glu Asn Ile Val Tyr Gly Pro Glu Pro

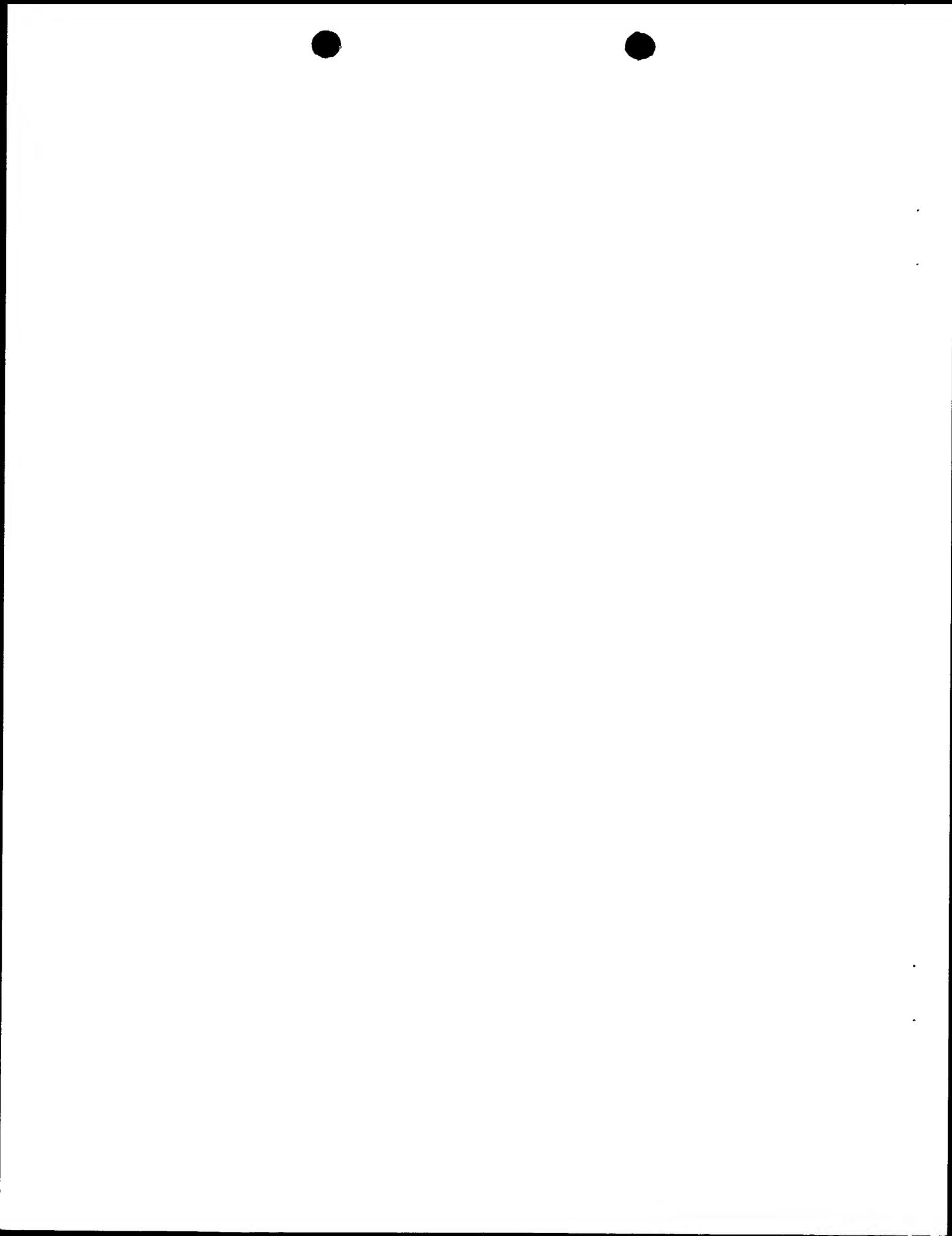
1

5

10

15

2 / 2 0



ttt tac cct att gaa gag gga tct gct gga gca caa ttg cgc aag tat 96

Phe Tyr Pro Ile Glu Glu Gly Ser Ala Gly Ala Gln Leu Arg Lys Tyr

20

25

30

atg gat cga tat gca aaa ctt gga gca att gct ttt act aac gca ctt 144

Met Asp Arg Tyr Ala Lys Leu Gly Ala Ile Ala Phe Thr Asn Ala Leu

35

40

45

acc ggt gtc gat tat acg tac gcc gaa tac tta gaa aaa tca tgc tgt 192

Thr Gly Val Asp Tyr Thr Tyr Ala Glu Tyr Leu Glu Lys Ser Cys Cys

50

55

60

cta gga gag gct tta aag aat tat ggt ttg gtt gat gga aga att 240

Leu Gly Glu Ala Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Val Val Asp Gly Arg Ile

65

70

75

80

gcg tta tgc agt gaa aac tgt gaa gaa ttc ttt att cct gta tta gcc 288

Ala Leu Cys Ser Glu Asn Cys Glu Glu Phe Phe Ile Pro Val Leu Ala

85

90

95

ggt tta ttt ata ggt gtc ggt gtg gct cca act aat gag att tac act 336

Gly Leu Phe Ile Gly Val Gly Val Ala Pro Thr Asn Glu Ile Tyr Thr

100

105

110

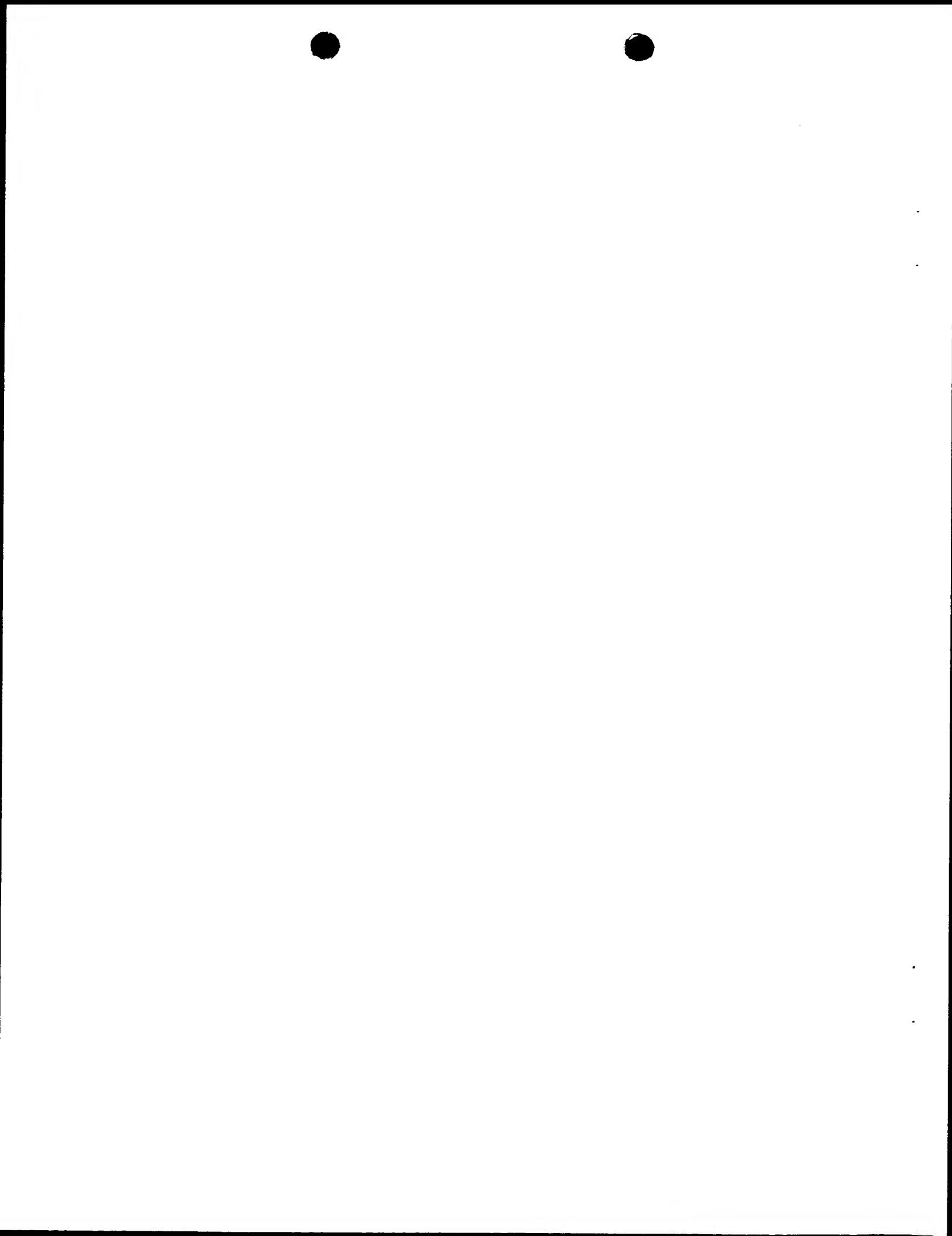
cta cgt gaa ttg gtt cac agt tta ggc atc tct aag cca aca att gta 384

Leu Arg Glu Leu Val His Ser Leu Gly Ile Ser Lys Pro Thr Ile Val

115

120

125



ttt agt tct aaa aaa gga tta gat aaa gtt ata act gta caa aaa acg 432  
Phe Ser Ser Lys Lys Gly Leu Asp Lys Val Ile Thr Val Gln Lys Thr  
130 135 140

gta act gct att aaa acc att gtt ata ttg gac agc aaa gtg gat tat 480  
Val Thr Ala Ile Lys Thr Ile Val Ile Leu Asp Ser Lys Val Asp Tyr  
145 150 155 160

aga ggt tat caa tcc atg gac aac ttt att aaa aaa aac act cca caa 528  
Arg Gly Tyr Gln Ser Met Asp Asn Phe Ile Lys Lys Asn Thr Pro Gln  
165 170 175

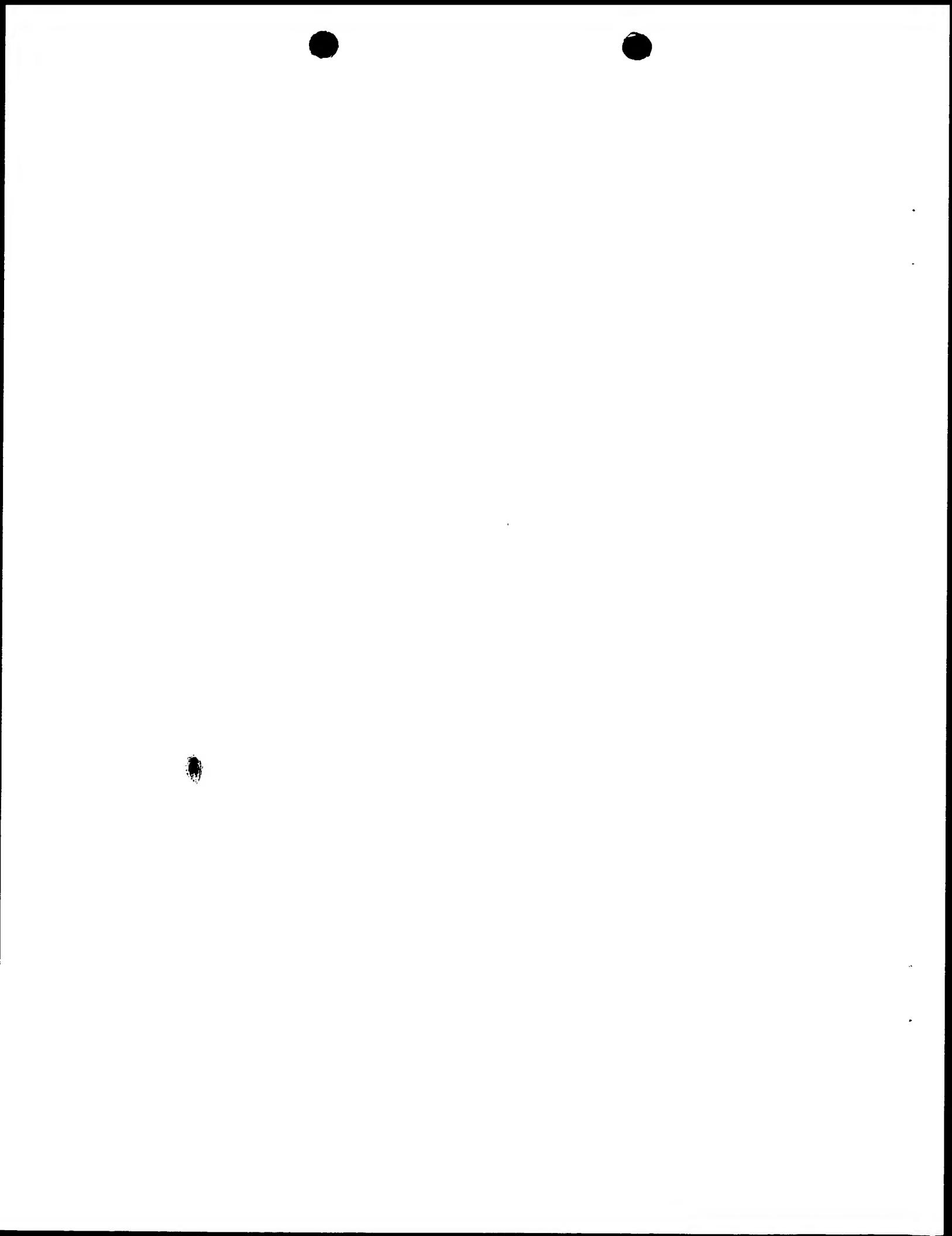
ggt ttc aaa gga tca agt ttt aaa act gta gaa gtt aac cgc aaa gaa 576  
Gly Phe Lys Gly Ser Ser Phe Lys Thr Val Glu Val Asn Arg Lys Glu  
180 185 190

caa gtt gct ctt ata atg aac tct tcg ggt tca acc ggt ttg cca aaa 624  
Gln Val Ala Leu Ile Met Asn Ser Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys  
195 200 205

ggt gtg caa ctt act cat gaa aat ttg gtc act aga ttt tct cac gct 672  
Gly Val Gln Leu Thr His Glu Asn Leu Val Thr Arg Phe Ser His Ala  
210 215 220

aga gat cca att tat gga aac caa gtt tca cca ggc acg gct att tta 720  
Arg Asp Pro Ile Tyr Gly Asn Gln Val Ser Pro Gly Thr Ala Ile Leu  
225 230 235 240

act gta gta cca ttc cat cat ggt ttt ggt atg ttt act act tta ggc 768



Thr Val Val Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu Gly

245

250

255

tat cta act tgt ggt ttt cgt att gtc atg tta acg aaa ttt gac gaa 816

Tyr Leu Thr Cys Gly Phe Arg Ile Val Met Leu Thr Lys Phe Asp Glu

260

265

270

gag act ttt tta aaa aca ctg caa gat tac aaa tgt tca agc gtt att 864

Glu Thr Phe Leu Lys Thr Leu Gln Asp Tyr Lys Cys Ser Ser Val Ile

275

280

285

ctt gta ccg act ttg ttt gca att ctt aat aga agt gaa tta ctc gat 912

Leu Val Pro Thr Leu Phe Ala Ile Leu Asn Arg Ser Glu Leu Leu Asp

290

295

300

aaa tat gat tta tca aat tta gtt gaa att gca tct ggc gga gca cct 960

Lys Tyr Asp Leu Ser Asn Leu Val Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro

305

310

315

320

tta tct aaa gaa att ggt gaa gct gtt gct aga cgt ttt aat tta ccg 1008

Leu Ser Lys Glu Ile Gly Glu Ala Val Ala Arg Arg Phe Asn Leu Pro

325

330

335

ggt gtt cgt caa ggc tat ggt tta aca gaa aca acc tct gca att att 1056

Gly Val Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Ile Ile

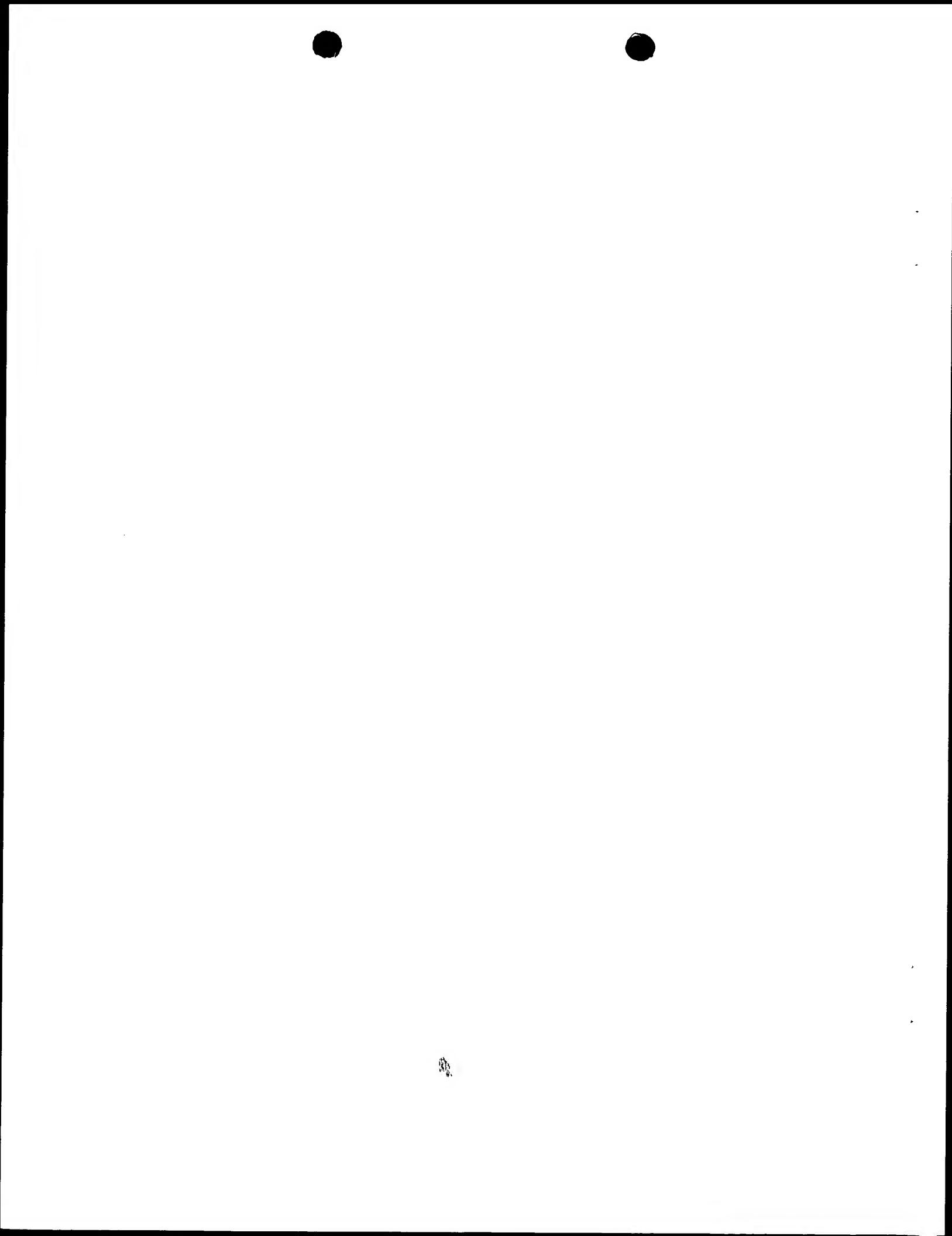
340

345

350

atc aca ccg gaa ggc gat gat aaa cca ggt gct tct ggc aaa gtt gtg 1104

Ile Thr Pro Glu Gly Asp Asp Lys Pro Gly Ala Ser Gly Lys Val Val



355

360

365

cca tta ttt aaa gca aaa gtt atc gat ctt gat act aaa aaa act ttg 1152

Pro Leu Phe Lys Ala Lys Val Ile Asp Leu Asp Thr Lys Lys Thr Leu

370

375

380

ggc ccg aac aga cgt gga gaa gtt tgt gta aag ggt cct atg ctt atg 1200

Gly Pro Asn Arg Arg Gly Glu Val Cys Val Lys Gly Pro Met Leu Met

385

390

395

400

aaa ggt tat gta gat aat cca gaa gca aca aga gaa atc ata gat gaa 1248

Lys Gly Tyr Val Asp Asn Pro Glu Ala Thr Arg Glu Ile Ile Asp Glu

405

410

415

gaa ggt tgg ttg cac aca gga gat att ggg tat tac gat gaa gaa aaa 1296

Glu Gly Trp Leu His Thr Gly Asp Ile Gly Tyr Tyr Asp Glu Glu Lys

420

425

430

cat ttc ttt atc gtg gat cgt ttg aag tct tta atc aaa tac aaa gga 1344

His Phe Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly

435

440

445

tat caa gta cca cct gct gaa tta gaa tct gtt ctt ttg caa cat cca 1392

Tyr Gln Val Pro Pro Ala Glu Leu Glu Ser Val Leu Leu Gln His Pro

450

455

460

aat att ttt gat gcc ggc gtt gct ggc gtt cca gat cct ata gct ggt 1440

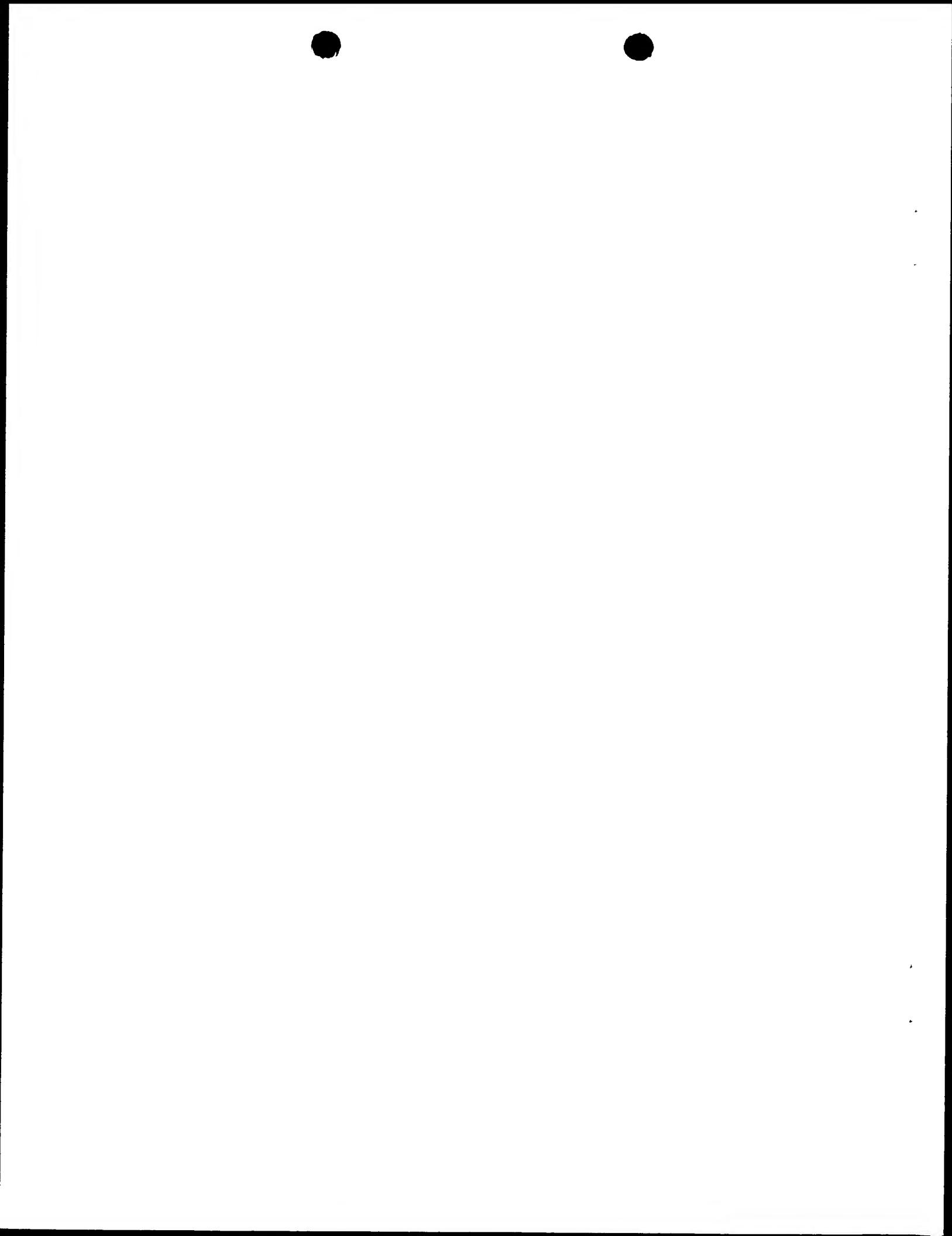
Asn Ile Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Val Pro Asp Pro Ile Ala Gly

465

470

475

480



gag ctt ccg gga gct gtt gtt gta ctt aag aaa gga aaa tct atg act 1488  
Glu Leu Pro Gly Ala Val Val Leu Lys Lys Gly Lys Ser Met Thr  
485 490 495

gaa aaa gaa gta atg gat tac gtt gct agt caa gtt tca aat gca aaa 1536  
Glu Lys Glu Val Met Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Ser Asn Ala Lys  
500 505 510

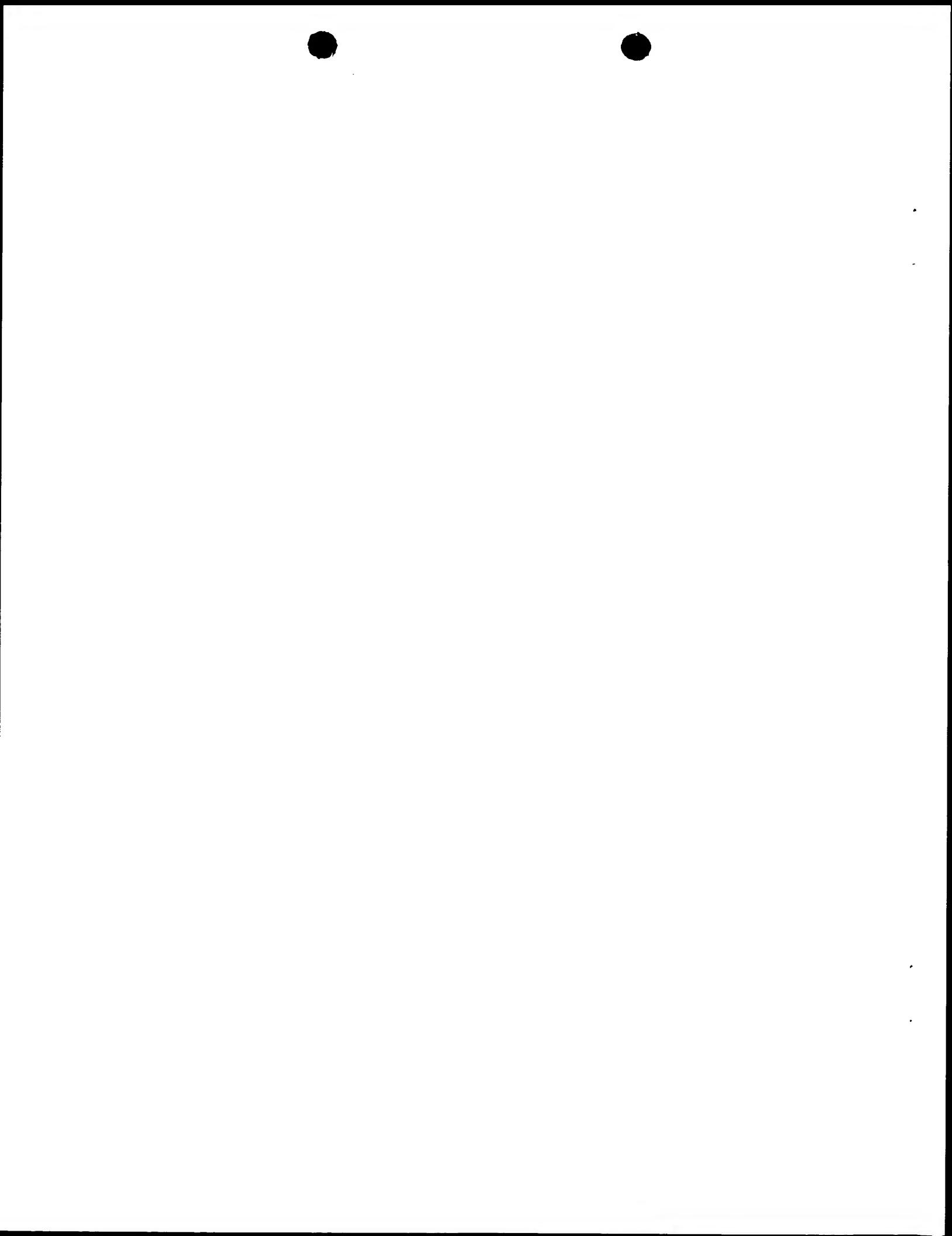
cgt ttg cgt ggt ggt gtc cgt ttt gtg gac gaa gta cct aaa ggt ctc 1584  
Arg Leu Arg Gly Gly Val Arg Phe Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu  
515 520 525

act ggt aaa att gac ggt aaa gca att aga gaa ata ctg aag aaa cca 1632  
Thr Gly Lys Ile Asp Gly Lys Ala Ile Arg Glu Ile Leu Lys Pro  
530 535 540

gtt gct aag atg 1644  
Val Ala Lys Met  
545

<210> 4  
<211> 548  
<212> PRT  
<213> *Luciola lateralis*  
<400> 4

Met Glu Asn Met Glu Asn Asp Glu Asn Ile Val Tyr Gly Pro Glu Pro  
1 5 10 15



Phe Tyr Pro Ile Glu Glu Gly Ser Ala Gly Ala Gln Leu Arg Lys Tyr

20

25

30

Met Asp Arg Tyr Ala Lys Leu Gly Ala Ile Ala Phe Thr Asn Ala Leu

35

40

45

Thr Gly Val Asp Tyr Thr Tyr Ala Glu Tyr Leu Glu Lys Ser Cys Cys

50

55

60

Leu Gly Glu Ala Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Val Val Asp Gly Arg Ile

65

70

75

80

Ala Leu Cys Ser Glu Asn Cys Glu Glu Phe Phe Ile Pro Val Leu Ala

85

90

95

Gly Leu Phe Ile Gly Val Gly Val Ala Pro Thr Asn Glu Ile Tyr Thr

100

105

110

Leu Arg Glu Leu Val His Ser Leu Gly Ile Ser Lys Pro Thr Ile Val

115

120

125

Phe Ser Ser Lys Lys Gly Leu Asp Lys Val Ile Thr Val Gln Lys Thr

130

135

140

Val Thr Ala Ile Lys Thr Ile Val Ile Leu Asp Ser Lys Val Asp Tyr

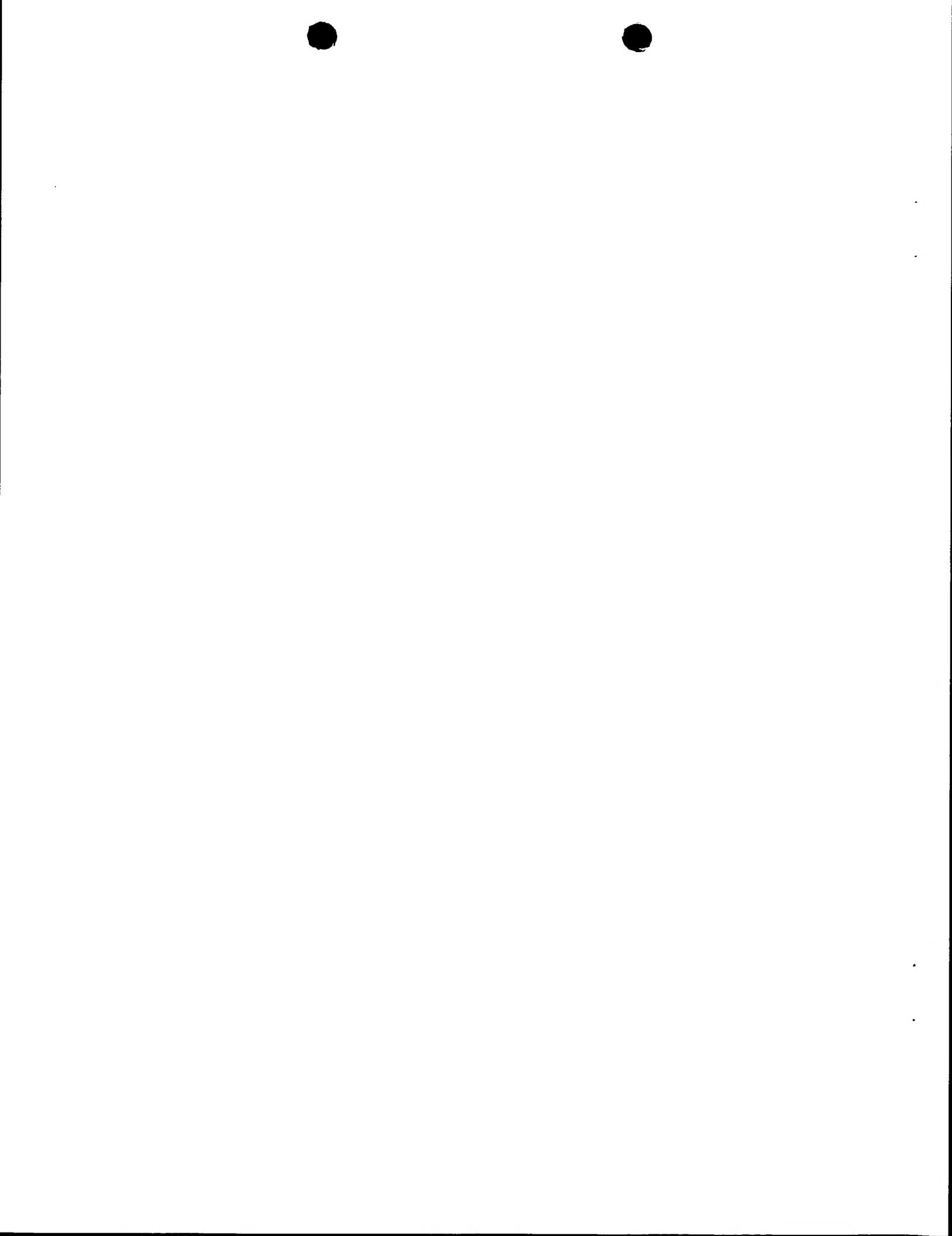
145

150

155

160

Arg Gly Tyr Gln Ser Met Asp Asn Phe Ile Lys Lys Asn Thr Pro Gln



165

170

175

Gly Phe Lys Gly Ser Ser Phe Lys Thr Val Glu Val Asn Arg Lys Glu

180

185

190

Gln Val Ala Leu Ile Met Asn Ser Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys

195

200

205

Gly Val Gln Leu Thr His Glu Asn Leu Val Thr Arg Phe Ser His Ala

210

215

220

Arg Asp Pro Ile Tyr Gly Asn Gln Val Ser Pro Gly Thr Ala Ile Leu

225

230

235

240

Thr Val Val Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu Gly

245

250

255

Tyr Leu Thr Cys Gly Phe Arg Ile Val Met Leu Thr Lys Phe Asp Glu

260

265

270

Glu Thr Phe Leu Lys Thr Leu Gln Asp Tyr Lys Cys Ser Ser Val Ile

275

280

285

Leu Val Pro Thr Leu Phe Ala Ile Leu Asn Arg Ser Glu Leu Leu Asp

290

295

300

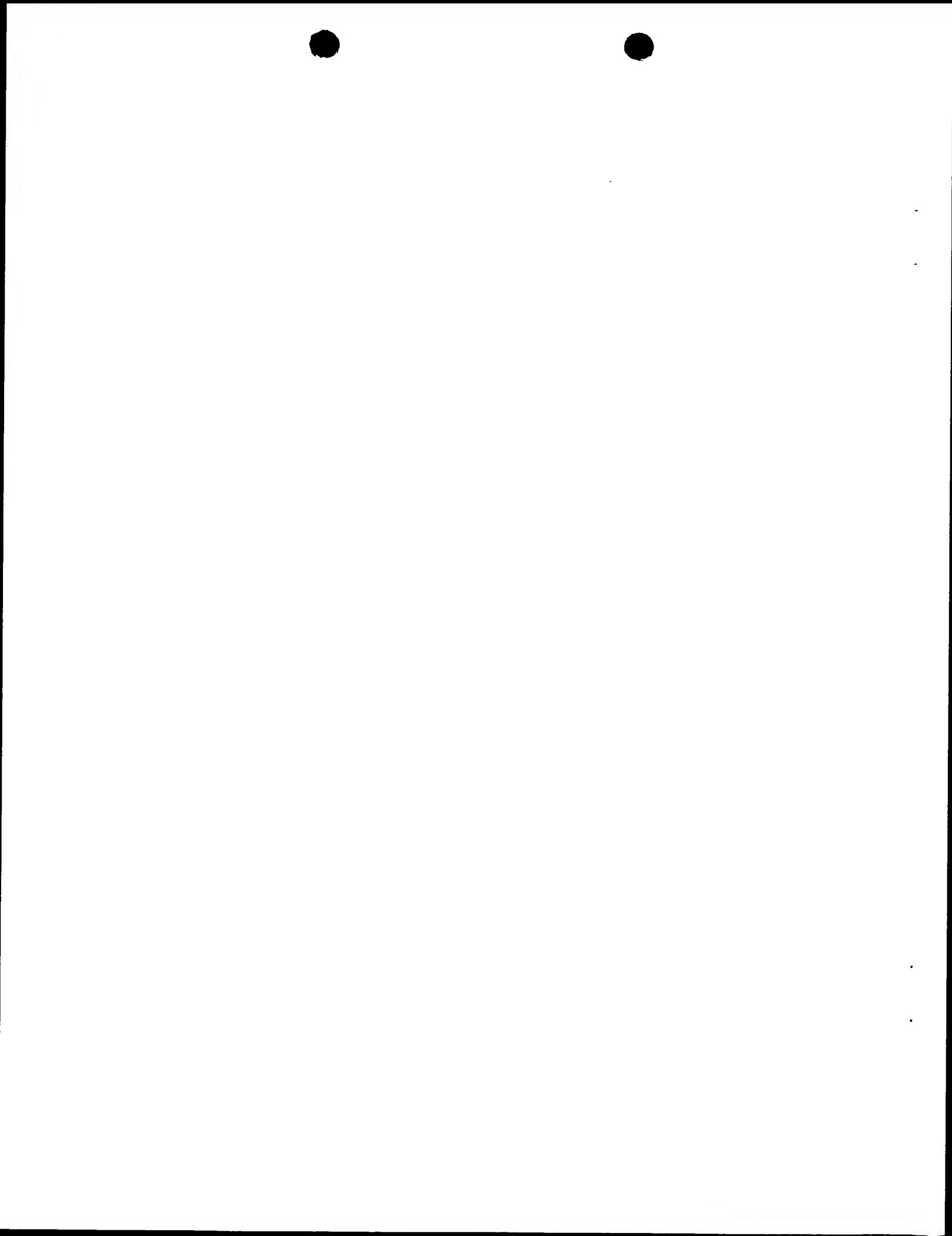
Lys Tyr Asp Leu Ser Asn Leu Val Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro

305

310

315

320



Leu Ser Lys Glu Ile Gly Glu Ala Val Ala Arg Arg Phe Asn Leu Pro

325 330 335

Gly Val Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Ile Ile

340 345 350

Ile Thr Pro Glu Gly Asp Asp Lys Pro Gly Ala Ser Gly Lys Val Val

355 360 365

Pro Leu Phe Lys Ala Lys Val Ile Asp Leu Asp Thr Lys Lys Thr Leu

370 375 380

Gly Pro Asn Arg Arg Gly Glu Val Cys Val Lys Gly Pro Met Leu Met

385 390 395 400

Lys Gly Tyr Val Asp Asn Pro Glu Ala Thr Arg Glu Ile Ile Asp Glu

405 410 415

Glu Gly Trp Leu His Thr Gly Asp Ile Gly Tyr Tyr Asp Glu Glu Lys

420 425 430

His Phe Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly

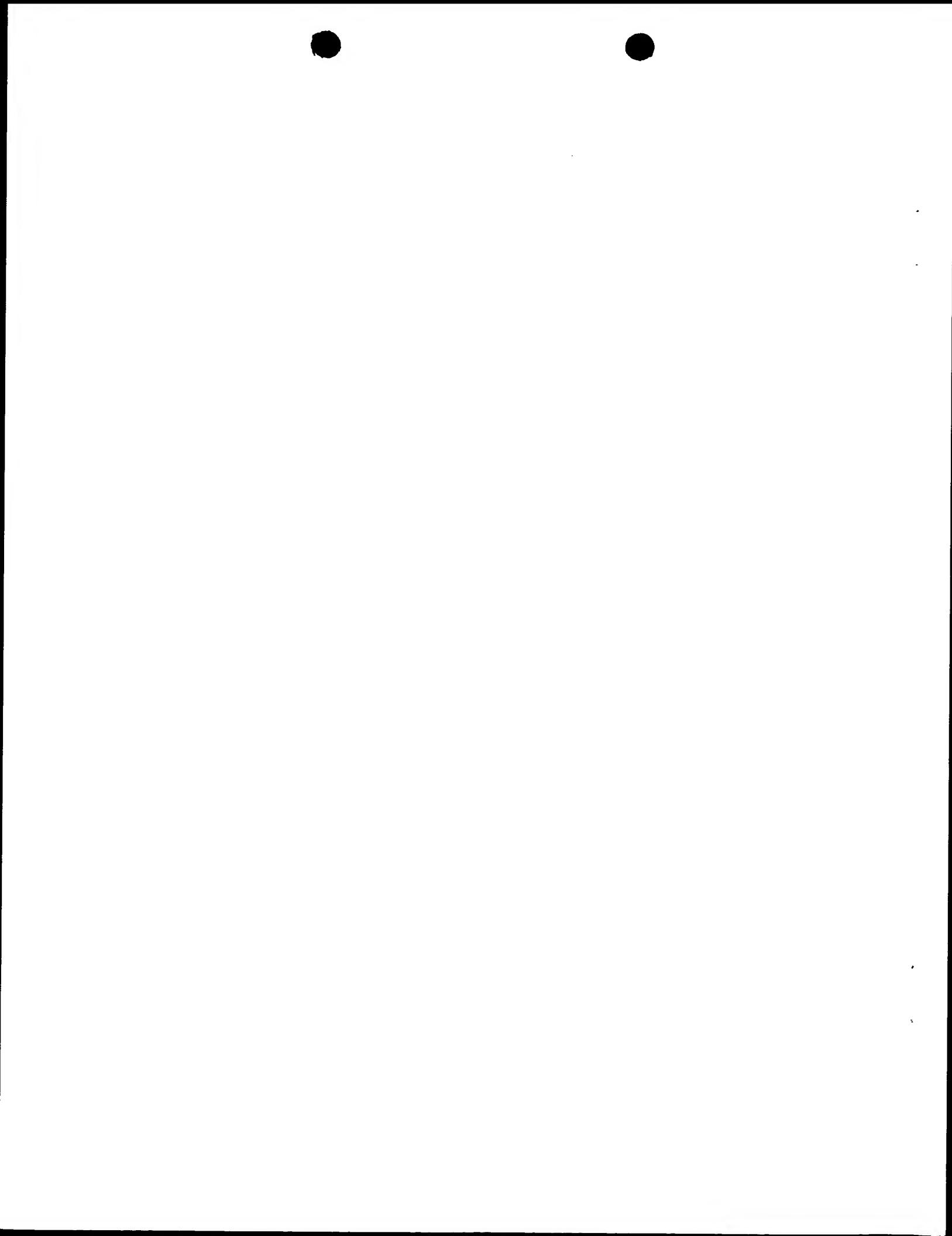
435 440 445

Tyr Gln Val Pro Pro Ala Glu Leu Glu Ser Val Leu Leu Gln His Pro

450 455 460

Asn Ile Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Val Pro Asp Pro Ile Ala Gly

465 470 475 480



Glu Leu Pro Gly Ala Val Val Val Leu Lys Lys Gly Lys Ser Met Thr

485

490

495

Glu Lys Glu Val Met Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Ser Asn Ala Lys

500

505

510

Arg Leu Arg Gly Gly Val Arg Phe Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu

515

520

525

Thr Gly Lys Ile Asp Gly Lys Ala Ile Arg Glu Ile Leu Lys Lys Pro

530

535

540

Val Ala Lys Met

545

<210> 5

<211> 1644

<212> DNA

<213> Luciola lateralis

<220>

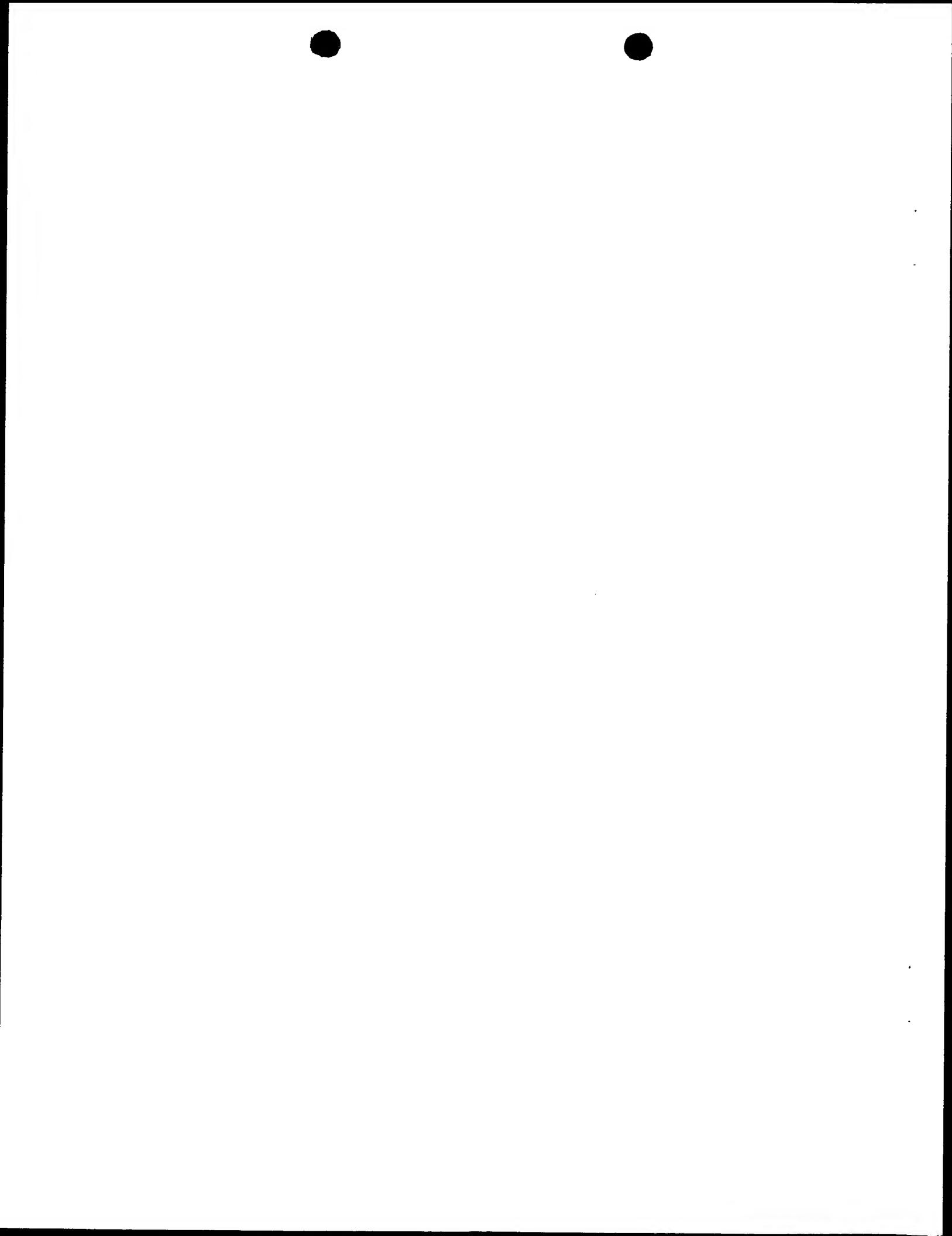
<221> CDS

<222> (1)..(1644)

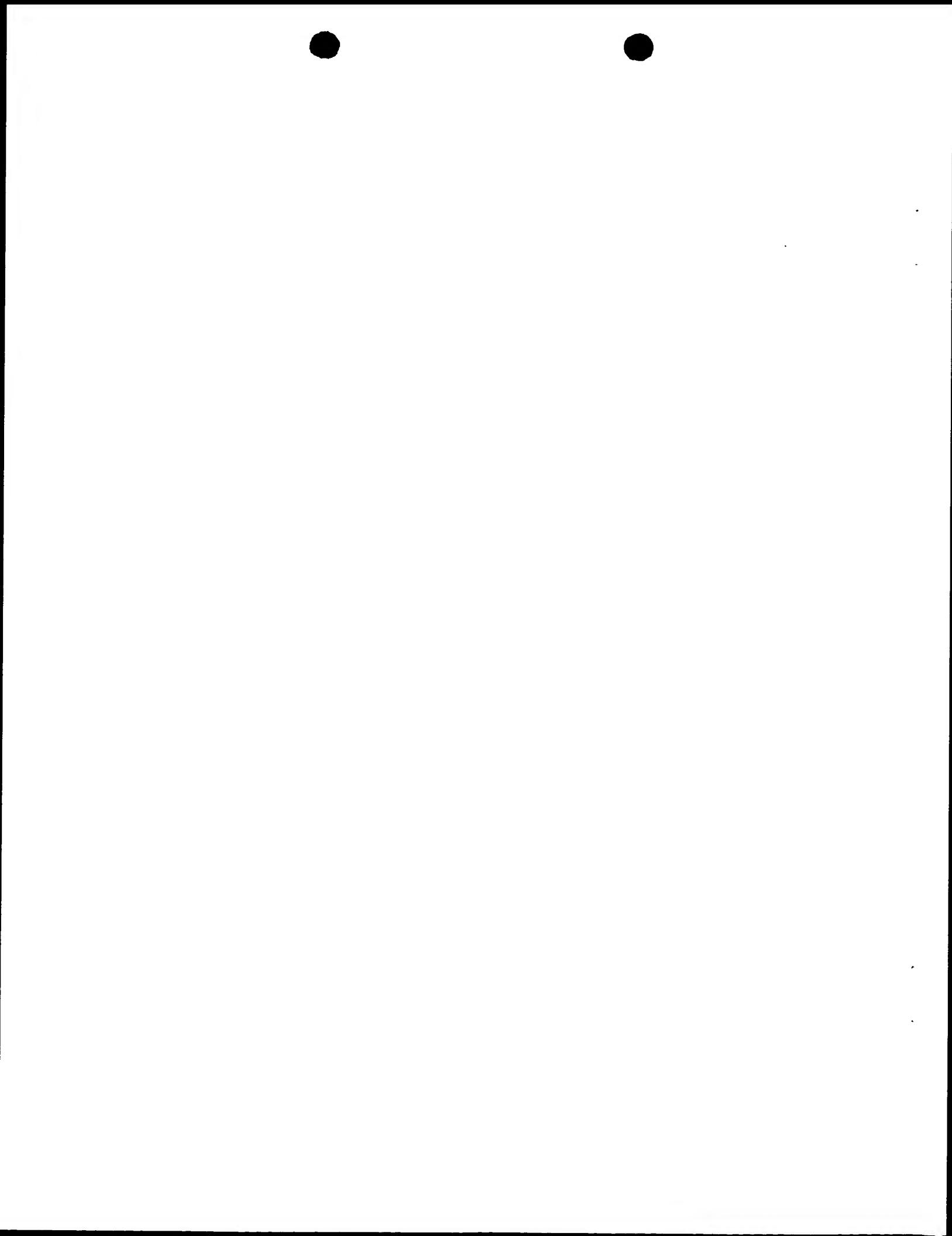
<400> 5

atg gaa aac atg gag aac gat gaa aat att gtg tat ggt cct gaa cca 48

Met Glu Asn Met Glu Asn Asp Glu Asn Ile Val Tyr Gly Pro Glu Pro



1	5	10	15
ttt tac cct att gaa gag gga tct gct gga gca caa ttg cgc aag tat 96			
Phe Tyr Pro Ile Glu Glu Gly Ser Ala Gly Ala Gln Leu Arg Lys Tyr			
20	25	30	
atg gat cga tat gca aaa ctt gga gca att gct ttt act aac gca ctt 144			
Met Asp Arg Tyr Ala Lys Leu Gly Ala Ile Ala Phe Thr Asn Ala Leu			
35	40	45	
acc ggt gtc gat tat acg tac gcc gaa tac tta gaa aaa tca tgc tgt 192			
Thr Gly Val Asp Tyr Thr Ala Glu Tyr Leu Glu Lys Ser Cys Cys			
50	55	60	
cta gga gag gct tta aag aat tat ggt ttg gtt gat gga aga att 240			
Leu Gly Glu Ala Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Val Val Asp Gly Arg Ile			
65	70	75	80
65 gct tta tgc agt gaa aac tgt gaa gaa ttc ttt att cct gta tta gcc 288			
Ala Leu Cys Ser Glu Asn Cys Glu Glu Phe Phe Ile Pro Val Leu Ala			
85	90	95	
ggt tta ttt ata ggt gtc ggt gtg gct cca act aat gag att tac act 336			
Gly Leu Phe Ile Gly Val Gly Val Ala Pro Thr Asn Glu Ile Tyr Thr			
100	105	110	
cta cgt gaa ttg gtt cac agt tta ggc atc tct aag cca aca att gta 384			
Leu Arg Glu Leu Val His Ser Leu Gly Ile Ser Lys Pro Thr Ile Val			
115	120	125	



ttt agt tct aaa aaa gga tta gat aaa gtt ata act gta caa aaa acg 432  
Phe Ser Ser Lys Lys Gly Leu Asp Lys Val Ile Thr Val Gln Lys Thr  
130 135 140

gta act gct att aaa acc att gtt ata ttg gac agc aaa gtg gat tat 480  
Val Thr Ala Ile Lys Thr Ile Val Ile Leu Asp Ser Lys Val Asp Tyr  
145 150 155 160

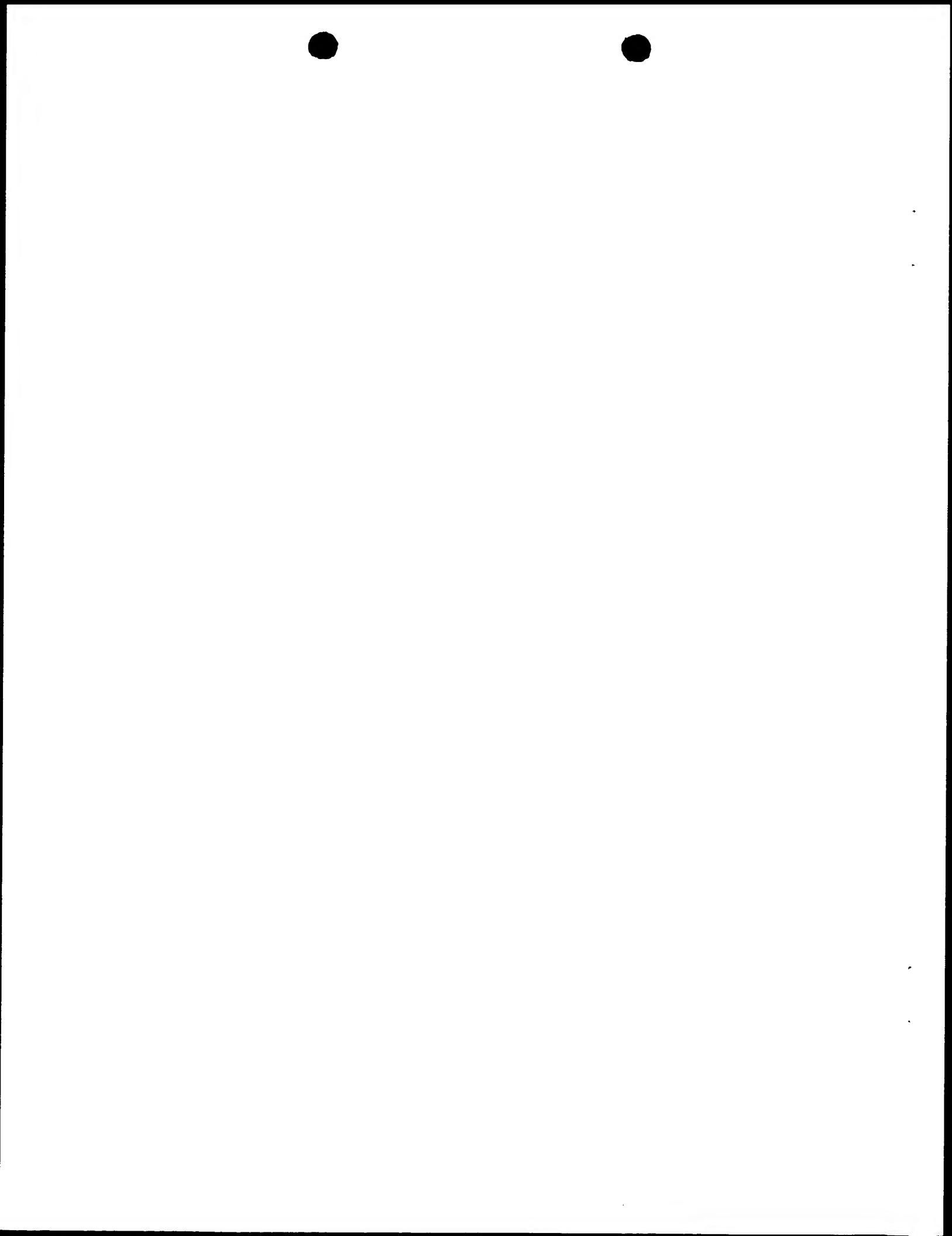
aga ggt tat caa tcc atg gac aac ttt att aaa aaa aac act cca caa 528  
Arg Gly Tyr Gln Ser Met Asp Asn Phe Ile Lys Lys Asn Thr Pro Gln  
165 170 175

ggt ttc aaa gga tca agt ttt aaa act gta gaa gtt aac cgc aaa gaa 576  
Gly Phe Lys Gly Ser Ser Phe Lys Thr Val Glu Val Asn Arg Lys Glu  
180 185 190

caa gtt gct ctt ata atg aac tct tcg ggt tca acc ggt ttg cca aaa 624  
Gln Val Ala Leu Ile Met Asn Ser Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys  
195 200 205

ggt gtg caa ctt act cat gaa aat atc gtc act aga ttt tct cac gct 672  
Gly Val Gln Leu Thr His Glu Asn Ile Val Thr Arg Phe Ser His Ala  
210 215 220

aga gat cca att tat gga aac caa gtt tca cca ggc acg gct att tta 720  
Arg Asp Pro Ile Tyr Gly Asn Gln Val Ser Pro Gly Thr Ala Ile Leu  
225 230 235 240



act gta gta cca ttc cat cat ggt ttt ggt atg ttt act act tta ggc 768

Thr Val Val Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu Gly

245

250

255

tat cta act tgt ggt ttt cgt att gtc atg tta acg aaa ttt gac gaa 816

Tyr Leu Thr Cys Gly Phe Arg Ile Val Met Leu Thr Lys Phe Asp Glu

260

265

270

gag act ttt tta aaa aca ctg caa gat tac aaa tgt tca agc gtt att 864

Glu Thr Phe Leu Lys Thr Leu Gln Asp Tyr Lys Cys Ser Ser Val Ile

275

280

285

ctt gta ccg act ttg ttt gca att ctt aat aga agt gaa tta ctc gat 912

Leu Val Pro Thr Leu Phe Ala Ile Leu Asn Arg Ser Glu Leu Leu Asp

290

295

300

aaa tat gat tta tca aat tta gtt gaa att gca tct ggc gga gca cct 960

Lys Tyr Asp Leu Ser Asn Leu Val Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro

305

310

315

320

tta tct aaa gaa att ggt gaa gct gtt gct aga cgt ttt aat tta ccg 1008

Leu Ser Lys Glu Ile Gly Glu Ala Val Ala Arg Arg Phe Asn Leu Pro

325

330

335

ggt gtt cgt caa ggc tat ggt tta aca gaa aca acc tct gca att att 1056

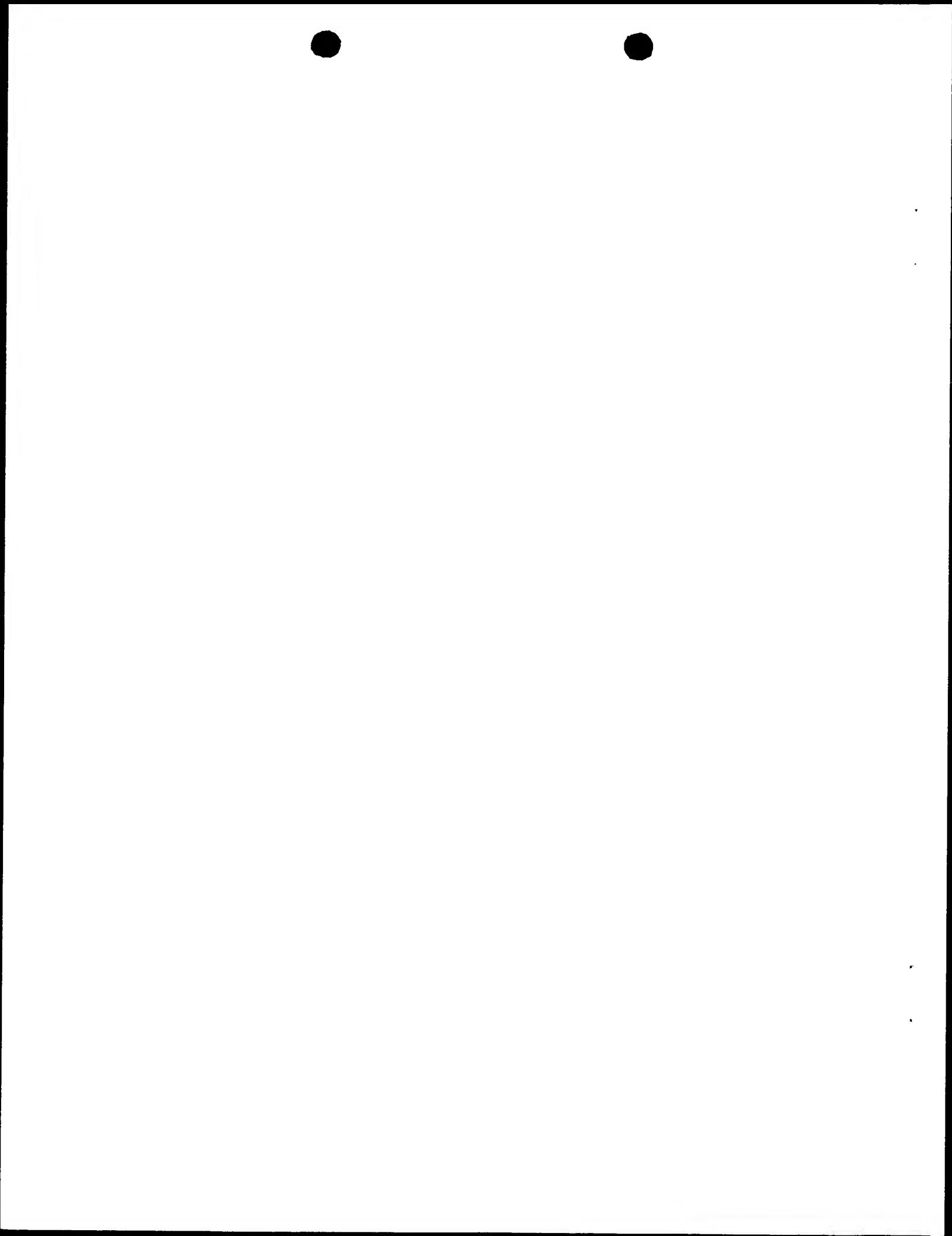
Gly Val Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Ile Ile

340

345

350

atc aca ccg gaa ggc gat gat aaa cca ggt gct tct ggc aaa gtt gtg 1104



Ile Thr Pro Glu Gly Asp Asp Lys Pro Gly Ala Ser Gly Lys Val Val

355 360 365

cca tta ttt aaa gca aaa gtt atc gat ctt gat act aaa aaa act ttg 1152

Pro Leu Phe Lys Ala Lys Val Ile Asp Leu Asp Thr Lys Lys Thr Leu

370 375 380

ggc ccg aac aga cgt gga gaa gtt tgt gta aag ggt cct atg ctt atg 1200

Gly Pro Asn Arg Arg Gly Glu Val Cys Val Lys Gly Pro Met Leu Met

385 390 395 400

aaa ggt tat gta gat aat cca gaa gca aca aga gaa atc ata gat gaa 1248

Lys Gly Tyr Val Asp Asn Pro Glu Ala Thr Arg Glu Ile Ile Asp Glu

405 410 415

gaa ggt tgg ttg cac aca gga gat att ggg tat tac gat gaa gaa aaa 1296

Glu Gly Trp Leu His Thr Gly Asp Ile Gly Tyr Tyr Asp Glu Glu Lys

420 425 430

cat ttc ttt atc gtg gat cgt ttg aag tct tta atc aaa tac aaa gga 1344

His Phe Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly

435 440 445

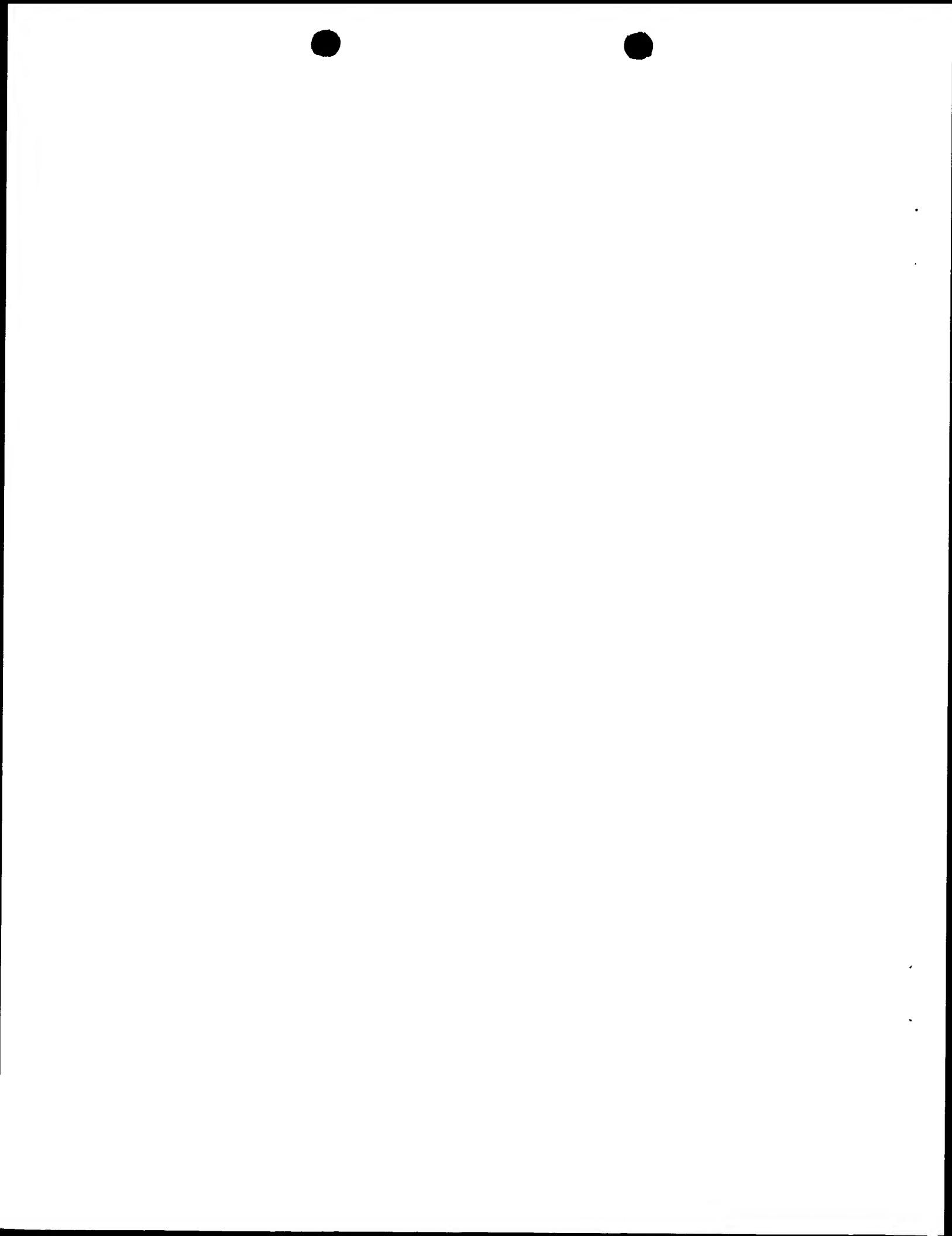
tat caa gta cca cct gct gaa tta gaa tct gtt ctt ttg caa cat cca 1392

Tyr Gln Val Pro Pro Ala Glu Leu Glu Ser Val Leu Leu Gln His Pro

450 455 460

aat att ttt gat gcc ggc gtt gct ggc gtt cca gat cct ata gct ggt 1440

Asn Ile Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Val Pro Asp Pro Ile Ala Gly



465

470

475

480

gag ctt ccg gga gct gtt gtt gta ctt aag aaa gga aaa tct atg act 1488  
Glu Leu Pro Gly Ala Val Val Val Leu Lys Lys Gly Lys Ser Met Thr

485

490

495

gaa aaa gaa gta atg gat tac gtt gct agt caa gtt tca aat gca aaa 1536  
Glu Lys Glu Val Met Asp Tyr Val Ala Ser Gin Val Ser Asn Ala Lys

500

505

510

cgt ttg cgt ggt ggt gtc cgt ttt gtg gac gaa gta cct aaa ggt ctc 1584  
Arg Leu Arg Gly Gly Val Arg Phe Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu

515

520

525

act ggt aaa att gac ggt aaa gca att aga gaa ata ctg aag aaa cca 1632  
Thr Gly Lys Ile Asp Gly Lys Ala Ile Arg Glu Ile Leu Lys Lys Pro

530

535

540

gtt gct aag atg 1644  
Val Ala Lys Met  
545

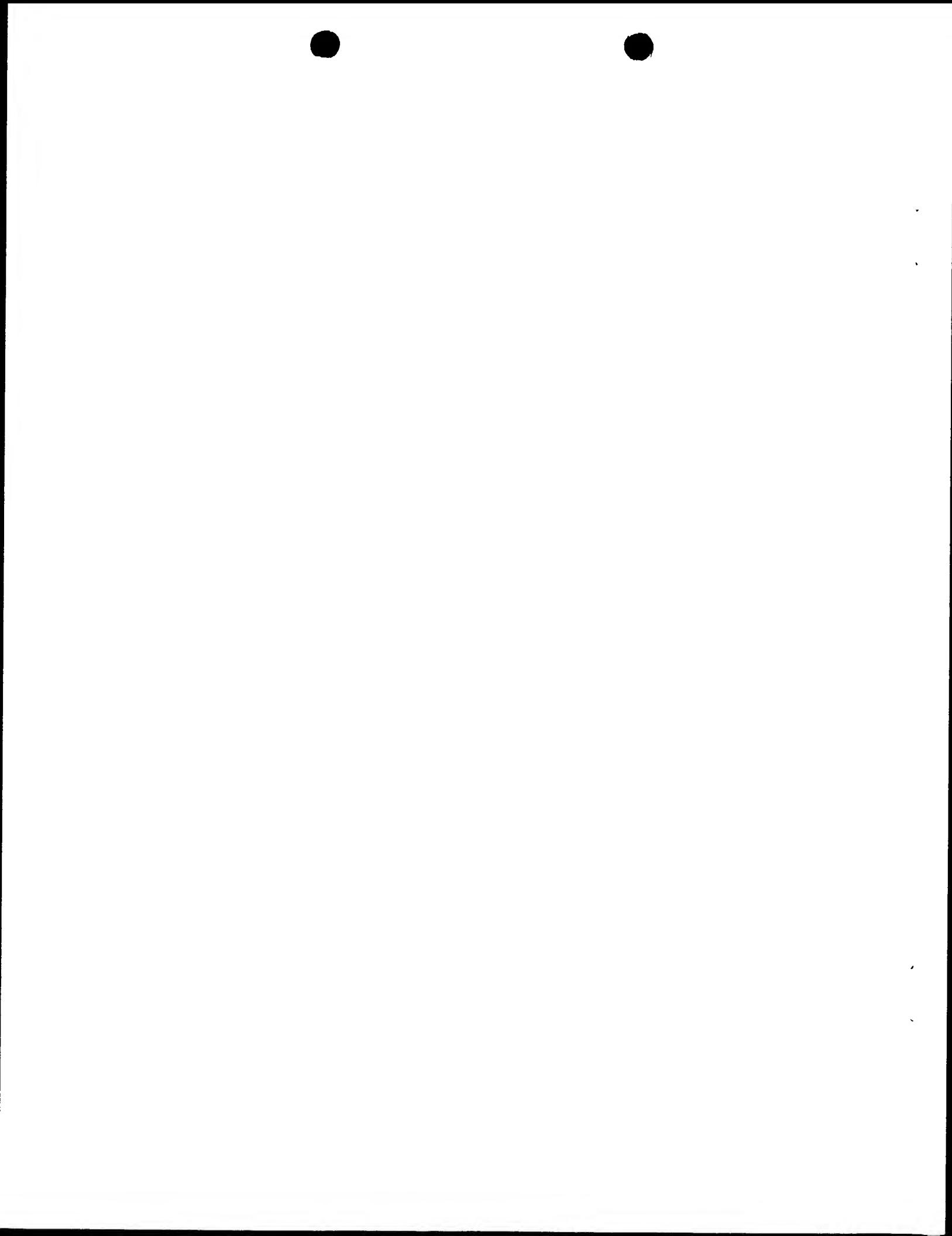
&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 548

&lt;212&gt; PRT

<213> *Luciola lateralis*

&lt;400&gt; 6



Met Glu Asn Met Glu Asn Asp Glu Asn Ile Val Tyr Gly Pro Glu Pro

1 5 10 15

Phe Tyr Pro Ile Glu Glu Gly Ser Ala Gly Ala Gln Leu Arg Lys Tyr

20 25 30

Met Asp Arg Tyr Ala Lys Leu Gly Ala Ile Ala Phe Thr Asn Ala Leu

35 40 45

Thr Gly Val Asp Tyr Thr Tyr Ala Glu Tyr Leu Glu Lys Ser Cys Cys

50 55 60

Leu Gly Glu Ala Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Val Val Asp Gly Arg Ile

65 70 75 80

Ala Leu Cys Ser Glu Asn Cys Glu Glu Phe Phe Ile Pro Val Leu Ala

85 90 95

Gly Leu Phe Ile Gly Val Gly Val Ala Pro Thr Asn Glu Ile Tyr Thr

100 105 110

Leu Arg Glu Leu Val His Ser Leu Gly Ile Ser Lys Pro Thr Ile Val

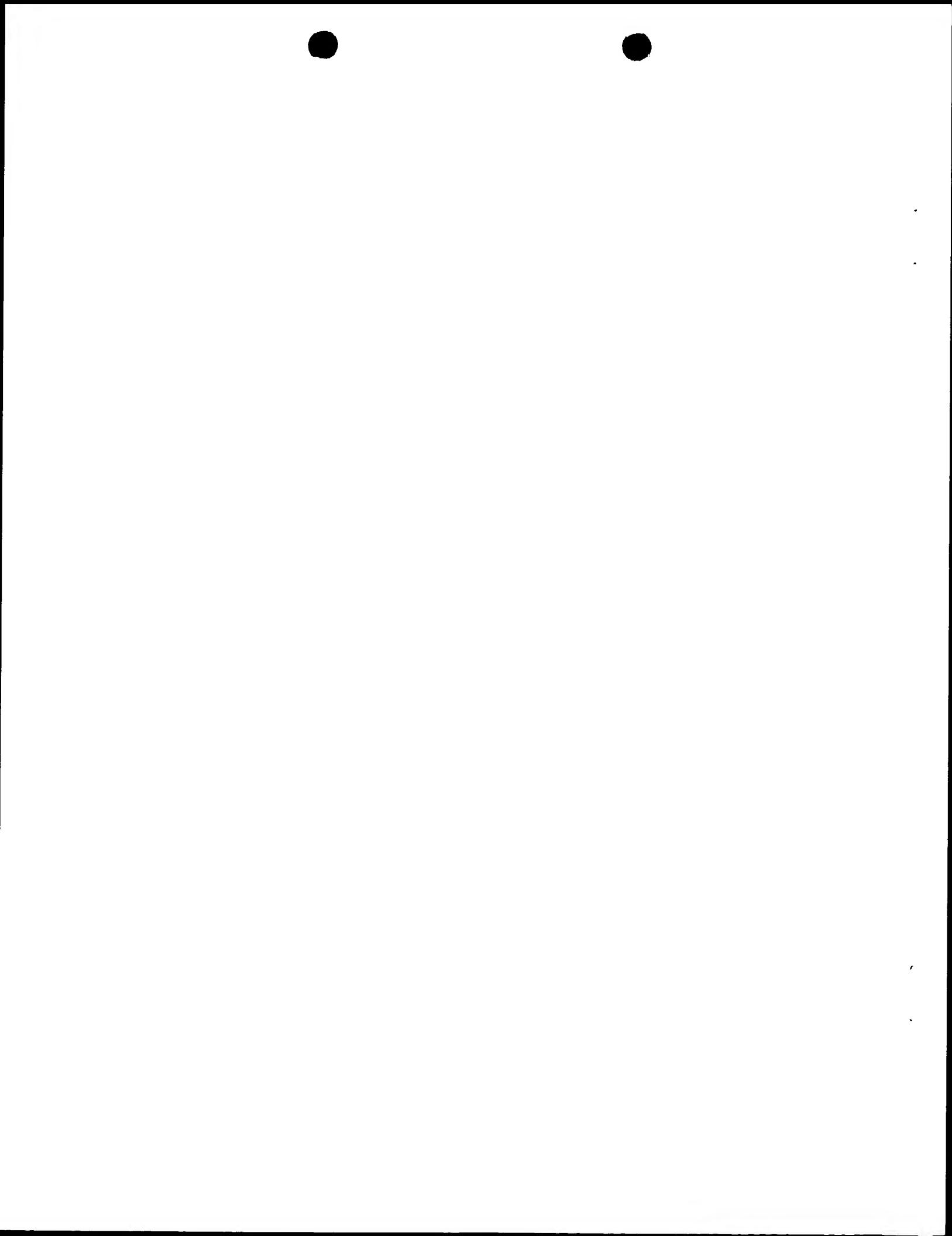
115 120 125

Phe Ser Ser Lys Lys Gly Leu Asp Lys Val Ile Thr Val Gln Lys Thr

130 135 140

Val Thr Ala Ile Lys Thr Ile Val Ile Leu Asp Ser Lys Val Asp Tyr

145 150 155 160



Arg Gly Tyr Gln Ser Met Asp Asn Phe Ile Lys Lys Asn Thr Pro Gln

165

170

175

Gly Phe Lys Gly Ser Ser Phe Lys Thr Val Glu Val Asn Arg Lys Glu

180

185

190

Gln Val Ala Leu Ile Met Asn Ser Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys

195

200

205

Gly Val Gln Leu Thr His Glu Asn Ile Val Thr Arg Phe Ser His Ala

210

215

220

Arg Asp Pro Ile Tyr Gly Asn Gln Val Ser Pro Gly Thr Ala Ile Leu

225

230

235

240

Thr Val Val Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu Gly

245

250

255

Tyr Leu Thr Cys Gly Phe Arg Ile Val Met Leu Thr Lys Phe Asp Glu

260

265

270

Glu Thr Phe Leu Lys Thr Leu Gln Asp Tyr Lys Cys Ser Ser Val Ile

275

280

285

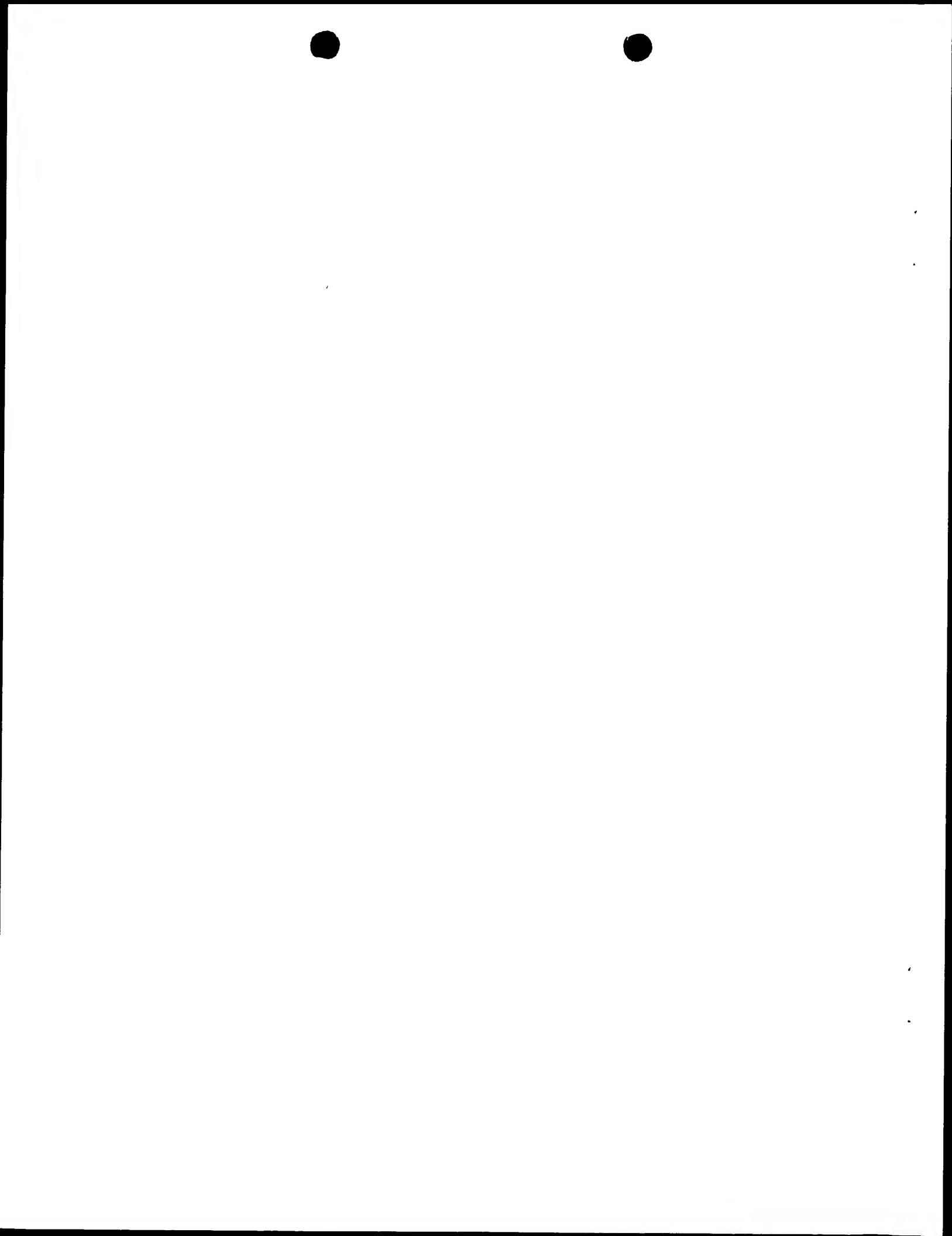
Leu Val Pro Thr Leu Phe Ala Ile Leu Asn Arg Ser Glu Leu Leu Asp

290

295

300

Lys Tyr Asp Leu Ser Asn Leu Val Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro



305

310

315

320

Leu Ser Lys Glu Ile Gly Glu Ala Val Ala Arg Arg Phe Asn Leu Pro

325

330

335

Gly Val Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Ile Ile

340

345

350

Ile Thr Pro Glu Gly Asp Asp Lys Pro Gly Ala Ser Gly Lys Val Val

355

360

365

Pro Leu Phe Lys Ala Lys Val Ile Asp Leu Asp Thr Lys Lys Thr Leu

370

375

380

Gly Pro Asn Arg Arg Gly Glu Val Cys Val Lys Gly Pro Met Leu Met

385

390

395

400

Lys Gly Tyr Val Asp Asn Pro Glu Ala Thr Arg Glu Ile Ile Asp Glu

405

410

415

Glu Gly Trp Leu His Thr Gly Asp Ile Gly Tyr Tyr Asp Glu Glu Lys

420

425

430

His Phe Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly

435

440

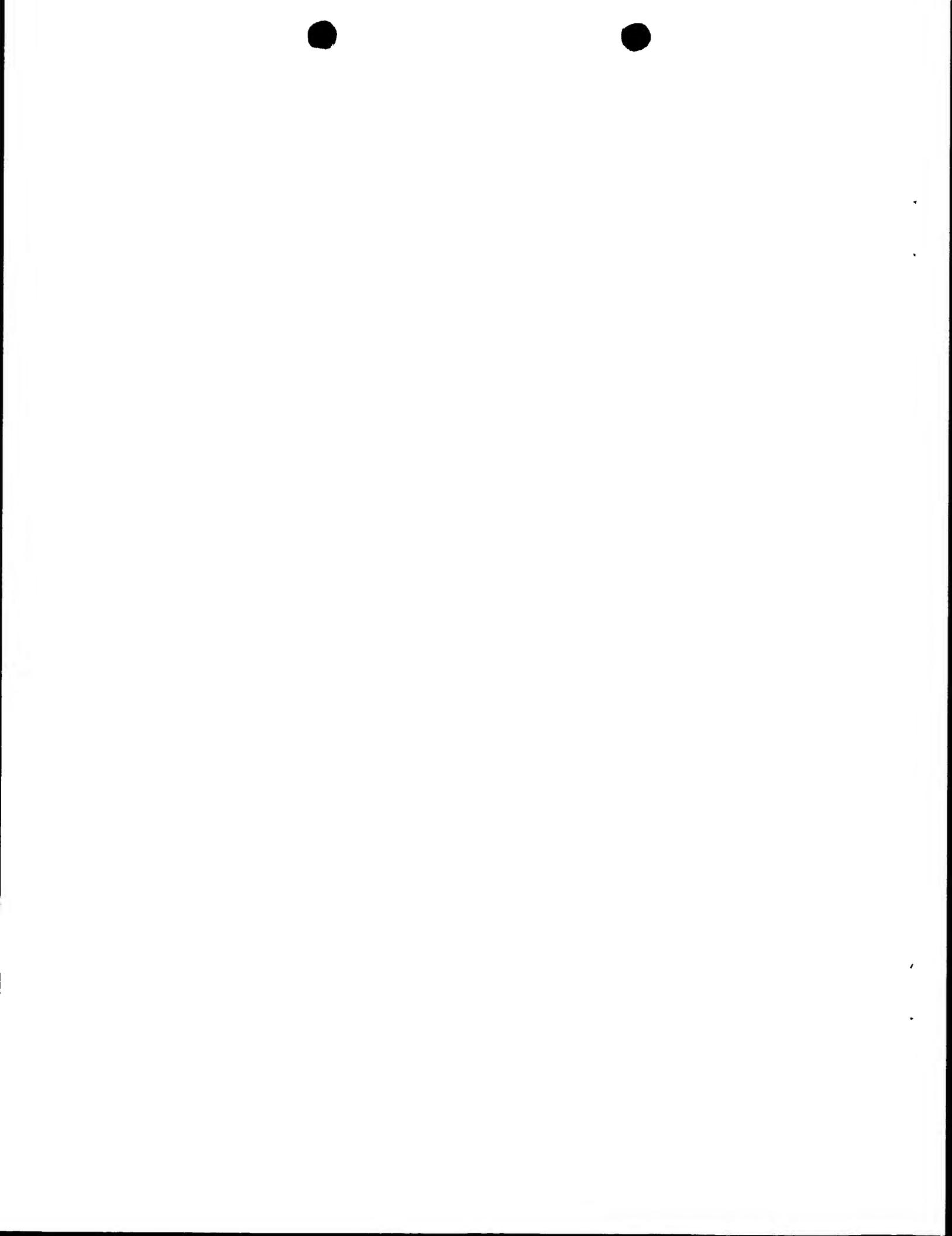
445

Tyr Gln Val Pro Pro Ala Glu Leu Glu Ser Val Leu Leu Gln His Pro

450

455

460



Asn Ile Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Val Pro Asp Pro Ile Ala Gly

465 470 475 480

Glu Leu Pro Gly Ala Val Val Val Leu Lys Lys Gly Lys Ser Met Thr

485 490 495

Glu Lys Glu Val Met Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Ser Asn Ala Lys

500 505 510

Arg Leu Arg Gly Gly Val Arg Phe Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu

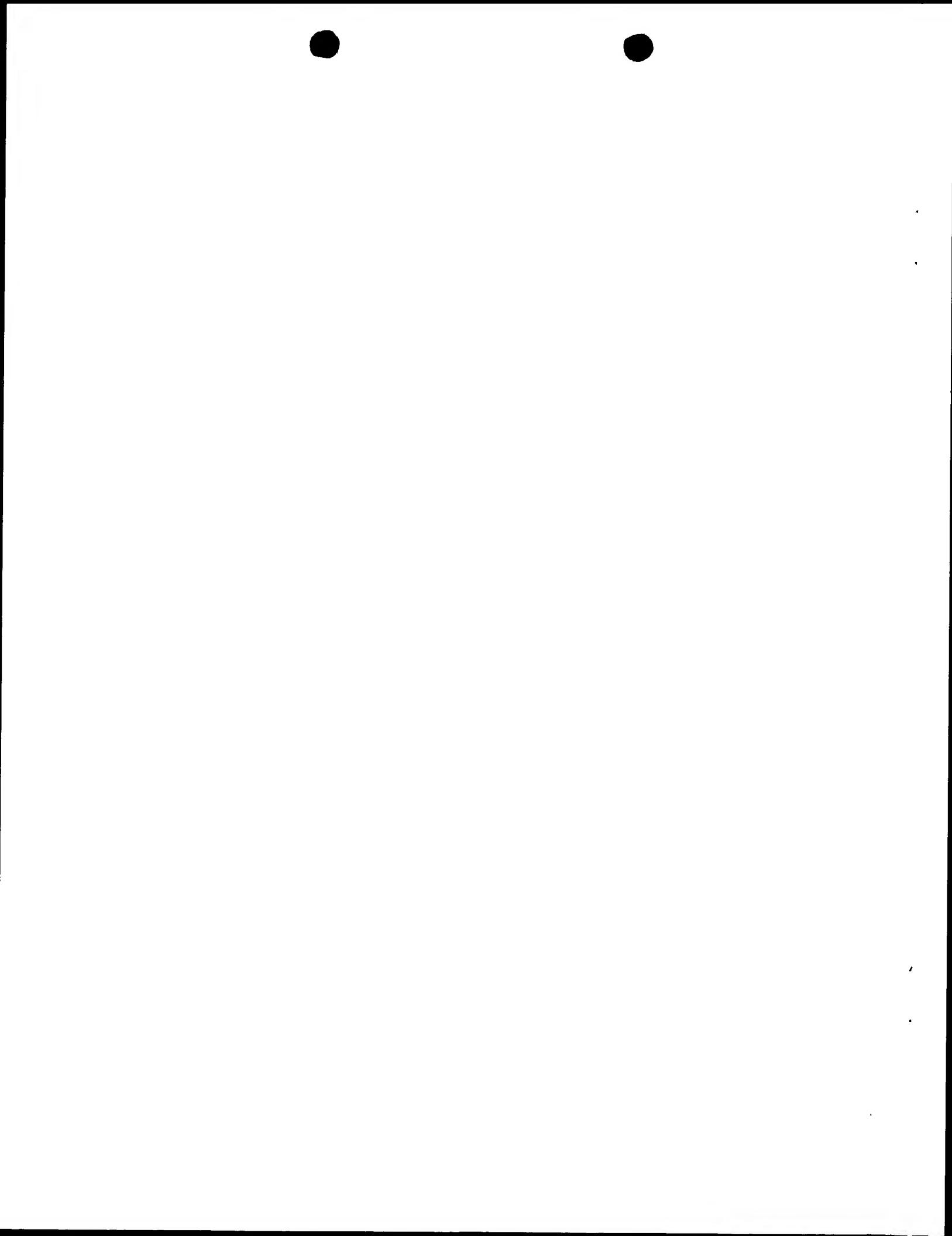
515 520 525

Thr Gly Lys Ile Asp Gly Lys Ala Ile Arg Glu Ile Leu Lys Lys Pro

530 535 540

Val Ala Lys Met

545



## 国際様式 INTERNATIONAL FORM

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PATENT PROCEDURE.

〔特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約〕

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い  
発行される

## 原寄託についての受託証

RECEIPT IN THE CASE  
DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7. 1 by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

氏名（名称） キッコーマン株式会社  
取締役社長 中野 孝三郎  
寄託者 殿  
あて名 ④ 278  
千葉県野田市野田 339 番地

## I. 微生物の表示

（寄託者が付した識別のための表示）

大腸菌 (E. coli) JM101 (pHLf7-217Lew)

（受託番号）

微研条第 3840 号  
(FERM BP- 3840 )

## II. 科学的性質及び分類学上の位置

I 桜の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

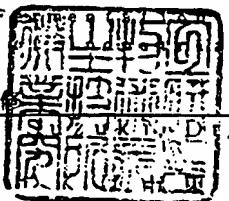
科学的性質  
 分類学上の位置

## III. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 4 年 4 月 22 日（原寄託日）に受領した I 桜の微生物を受託する。

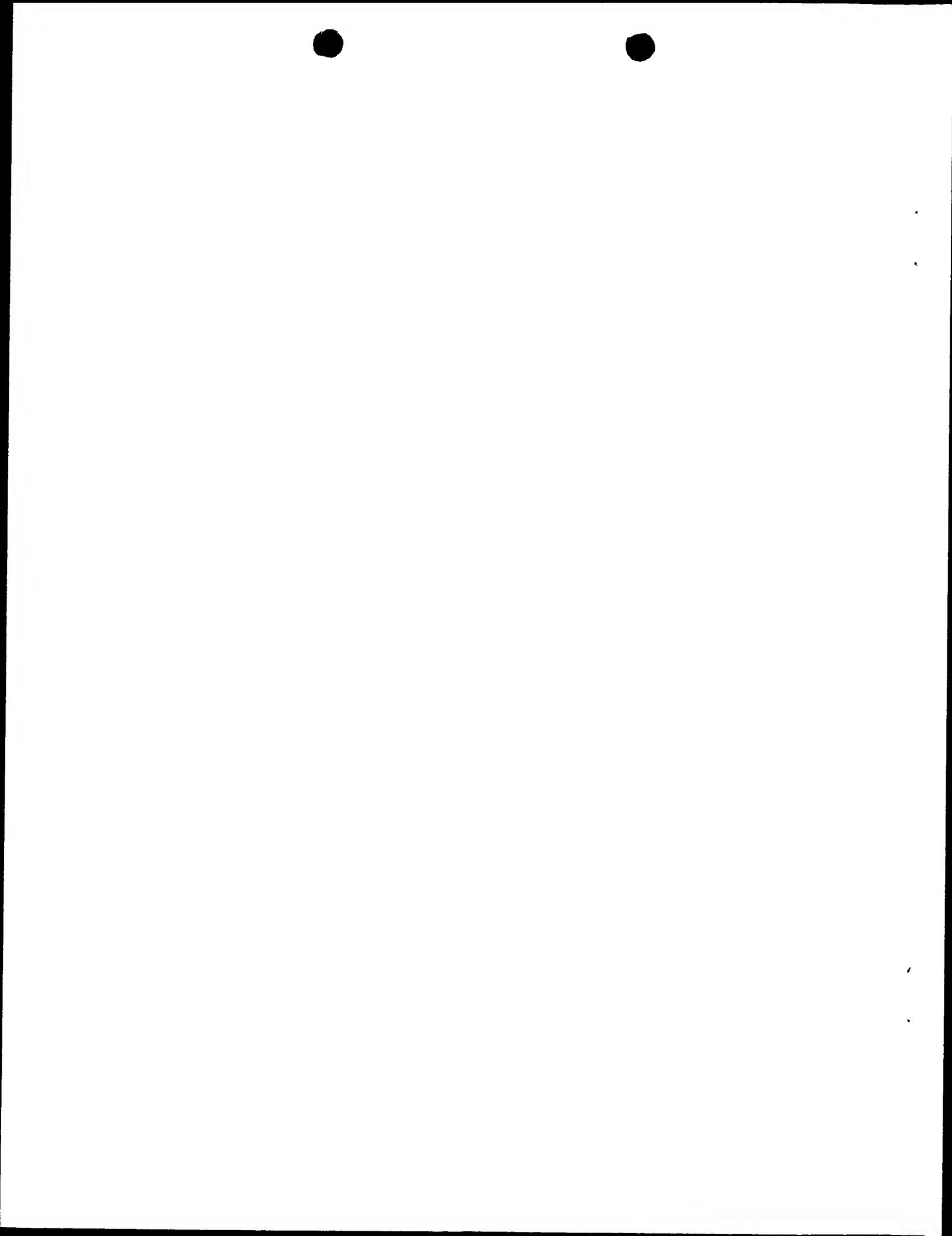
## IV. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所

名 称： Agency of Natural Science and Technology Research Institute  
所 長：  Director General, Osamu Kondo

あて名： 日本国茨城県水戸市東町1丁目1番3号（郵便番号305）  
1-3, Higashi 1-chome, Ibaraki-shi, Ibaraki-ken  
305, JAPAN

平成 4 年 (1992) 4 月 22 日



## 国際様式 INTERNATIONAL FORM

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い  
発行される

## 原寄託についての受託証

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF  
MICROORGANISMS FOR THE  
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE -  
DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY  
identified at the bottom of this  
page.

氏名（名称） キッコーマン株式会社  
取締役社長 中野 孝三郎  
寄託者 殿  
あて名 ④ 278  
千葉県野田市野田339番地

## I. 微生物の表示

（寄託者が付した識別のための表示）

大腸菌 (E. coli) JM101 (pHILf7-21711v)

（受託番号）

微生物研究室第 3841 号  
(FERM BP- 3841 )

## II. 科学的性質及び分類学上の位置

I欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

科学的性質  
 分類学上の位置

## III. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 4年 4月 22日（原寄託日）に受領したI欄の微生物を受託する。

## IV. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所

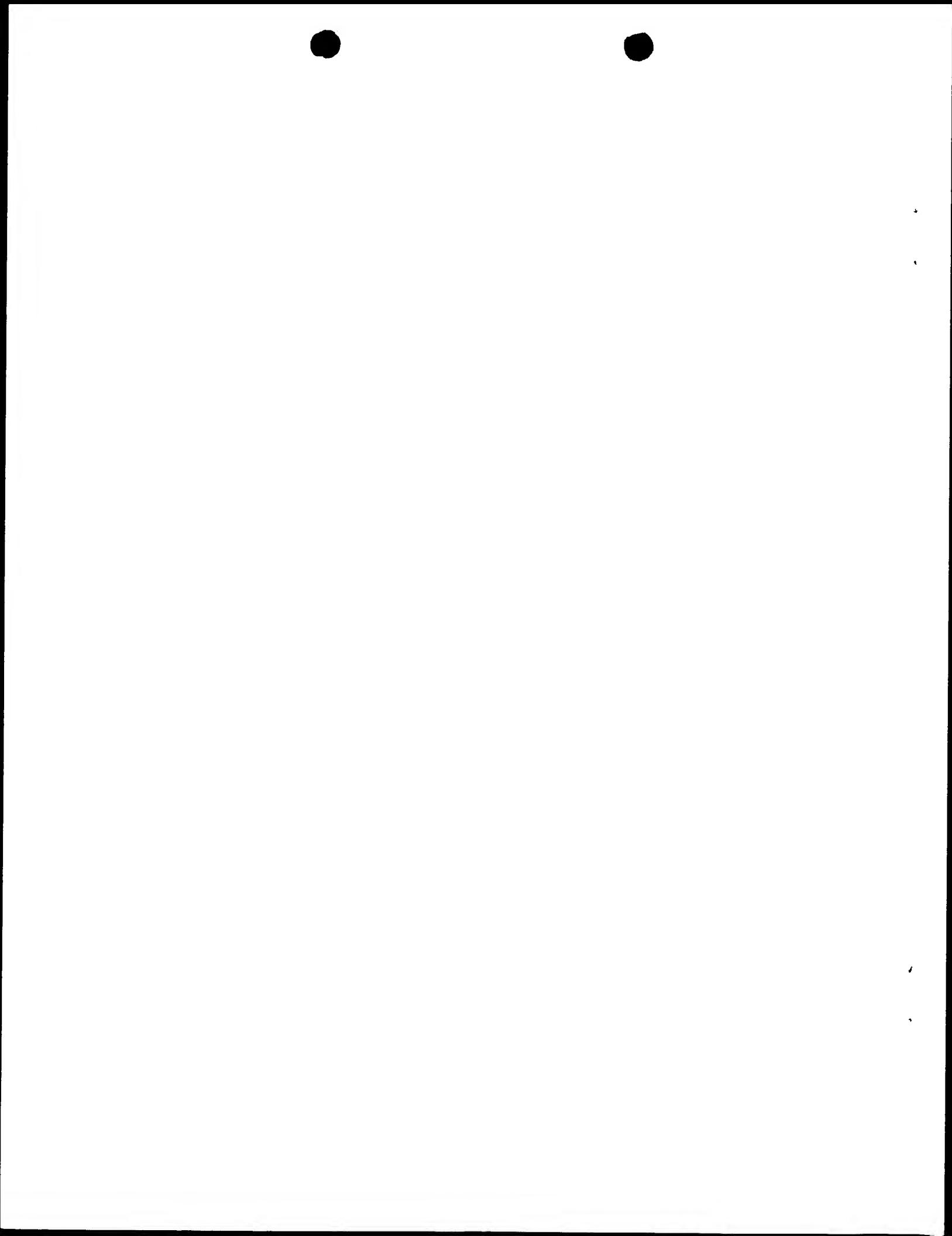
名称：

Agency for Natural Science and Technology  
Research Institute

所長

鈴木 伸一郎  
Osamu Suzuki, DIRECTOR GENERAL.

あて名：日本国茨城県水戸市東一丁目1番3号（郵便番号305）  
1-3, Higashi 1-chome, Tsuchikubashi, Ibaraki-ken  
305, JAPAN



国際様式 INTERNATIONAL FORM

## BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE MICROORGANISMS FOR PATENT PURPOSES

[ 特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約 ]

## RECEIPT IN THE CASE DEPOSIT

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い  
発行される。

## 原寄託についての受託証

issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

氏名（名称） キッコーマン株式会社

取締役社長 茂木 友三郎

寄託者

あて名 〒 278

千葉県野田市野田 339番地

殿

## 1. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)

大腸菌 (E. coli) JM109 (pHLfIK)

(受託番号)

FERM BP- 6146

## 2. 科学的性質及び分類学上の位置

1 案の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

科学的性質  
 分類学上の位置

## 3. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 9 年 10 月 16 日（原寄託日）に受領した1 案の微生物を受託する。

## 4. 移管請求の受領

本国際寄託当局は、 年 月 日（原寄託日）に1 案の微生物を受領した。  
 そして、 年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

## 5. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

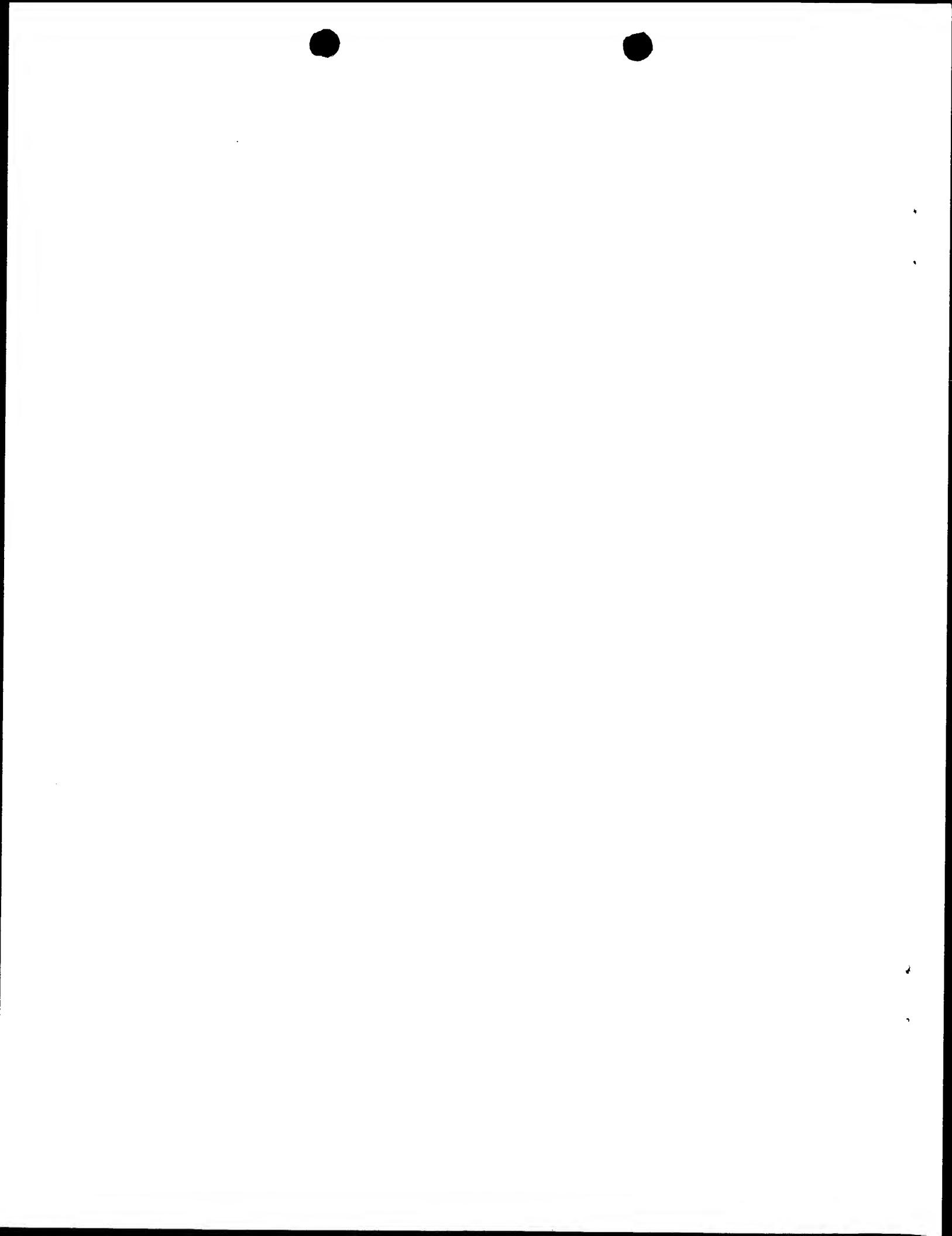
名称： National Institute of Bioscience and Human-Technology  
 Agency of Industrial Science and Technology

所長 大曾 信一

Dr. Shigenori Ochiai Director-General

あて名： 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305）  
 1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken  
 305, JAPAN

平成 9 年 (1997) 10 月 16 日



[特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約]

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い  
発行される。

## 原寄託についての受託証

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF  
MICROORGANISMS FOR THE  
PATENT PROCEDURERECEIPT IN THE CASE OF  
DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY  
identified at the bottom of this  
page.

氏名（名称） キッコーマン株式会社  
取締役社長 茂木 友三郎

寄託者

あて名 〒 278  
千葉県野田市野田339番地

殿

## 1. 微生物の表示

（寄託者が付した識別のための表示）  
大腸菌 (E. coli) JM109 (pHLfLX)

（受託番号）  
FERM BP- 6147

## 2. 科学的性質及び分類学上の位置

1 條の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

科学的性質  
 分類学上の位置

## 3. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 9 年 10 月 16 日（原寄託日）に受領した 1 條の微生物を受託する。

## 4. 移管請求の受領

本国際寄託当局は、 年 月 日（原寄託日）に 1 條の微生物を受領した。  
そして、 年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

## 5. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

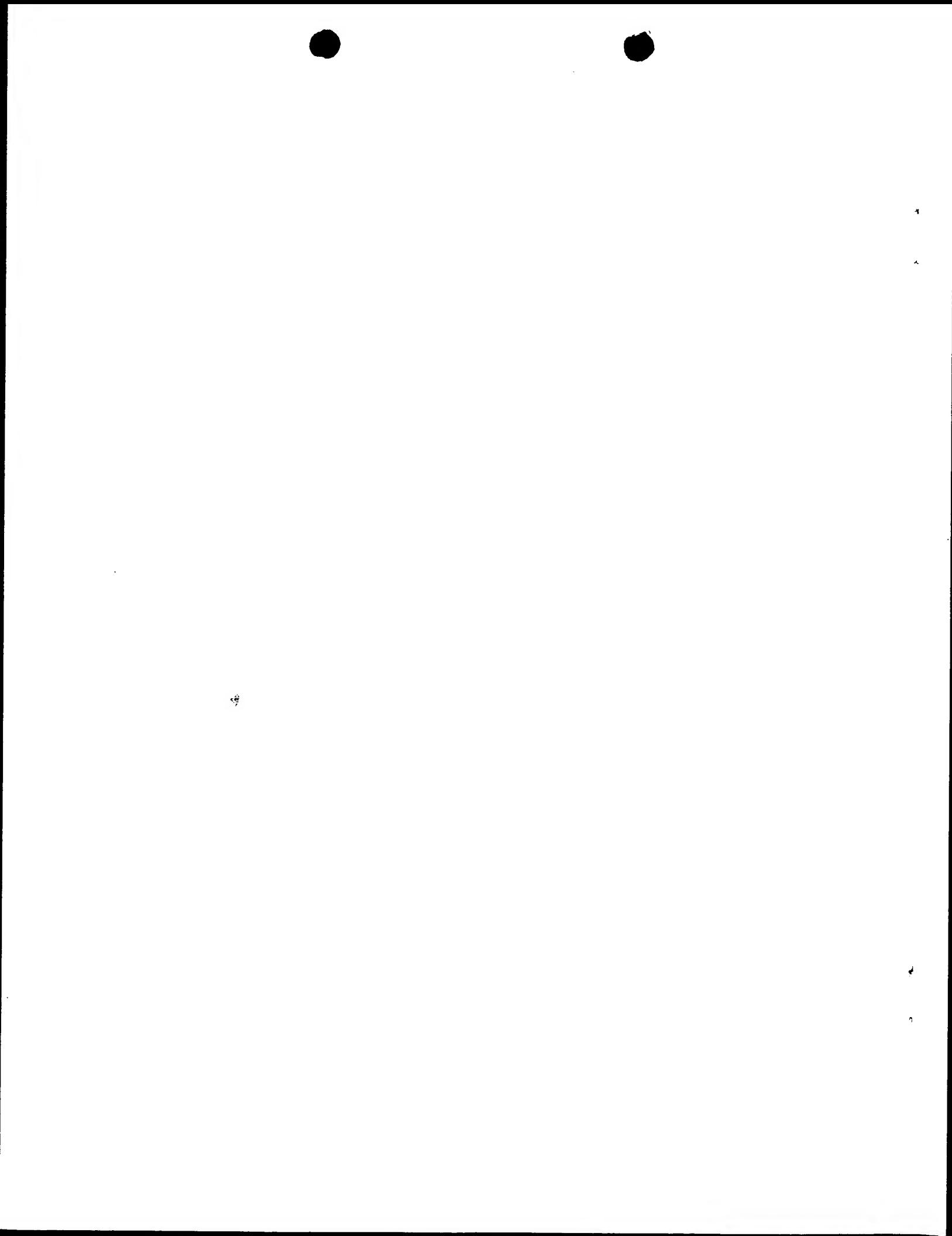
名称: National Institute for Biotechnology  
Agency of Natural Resources and  
Industrial Science and Technology

所長 大曾 信一

Dr. Shigenori Ochiai Director-General

あて名: 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305）  
1-3, Higashib 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken  
305, JAPAN

平成 9 年 (1997) 10 月 16 日



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP98/05864

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
**Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/53, C12N9/02, C12N15/63, C12N1/21, C12Q1/26**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

**Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/53, C12N9/02, C12N15/63, C12N1/21, C12Q1/26**

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
**BIOSIS (DIALOG), JICST File (JOIS), GeneBank/EMBL/DDBJ (GENETYX)**

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, 7-203995, A (Toa Electronics Ltd.), 8 August, 1995 (08. 08. 95), Full text ; Fig. 1 (Family: none)	1, 6-13
Y	JP, 6-504200, A (Amersham International PLC), 19 May, 1994 (19. 05. 94), Full text ; Figs. 1 to 20 & WO, 92/12253, A1 & EP, 566625, A1 & US, 5558986, A	1, 6-13
Y	W.J. Simpson et al., "The Effect of Detergents on Firefly Luciferase Reactions", Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence, Vol. 6(2), 1991, p.97-106	1, 6-13
Y	JP, 5-244942, A (Kikkoman Corp.), 24 September, 1993 (24. 09. 93), Full text ; Figs. 1, 2 & EP, 524448, A1 & US, 5229285, A	1, 6-13

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

"A"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier document but published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search  
**17 March, 1999 (17. 03. 99)**

Date of mailing of the international search report  
**30 March, 1999 (30. 03. 99)**

Name and mailing address of the ISA/  
**Japanese Patent Office**

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/05864

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 2-171189, A (Kikkoman Corp.), 2 July, 1990 (02. 07. 90), Full text ; Figs. 1 to 8 & EP, 353464, B1	1-9
A	Hiroki Tatsumi et al., "Molecular Cloning and Expression in Escherichia Coli of a cDNA Clone Encoding Luciferase of a Firefly, <i>Luciola Lateralis</i> ", <i>Biochimica et Biophysica Acta</i> , Vol. 1131, 1992, p.161-165	1-9
A	Tsutomu Masuda et al., "Cloning and Sequence Analysis of cDNA for Luciferase of a Japanese Firefly, <i>Luciola Crucifera</i> ", <i>Gene</i> , Vol. 77, 1988, p.265-270	1-9

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE  
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL  
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:  
 HIRAKI, Yusuke  
 Toranomon Mori Building  
 3rd floor  
 17-1, Toranomon 1-chome  
 Minato-ku  
 Tokyo 105-0001  
 JAPON



Date of mailing (day/month/year) 08 July 1999 (08.07.99)		IMPORTANT NOTICE	
Applicant's or agent's file reference PH-595-PCT			
International application No. PCT/JP98/05864	International filing date (day/month/year) 24 December 1998 (24.12.98)	Priority date (day/month/year) 26 December 1997 (26.12.97)	
Applicant KIKKOMAN CORPORATION et al			

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:

AU,EP,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

CA

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 08 July 1999 (08.07.99) under No. WO 99/33997

**REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)**

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a **demand for international preliminary examination** must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

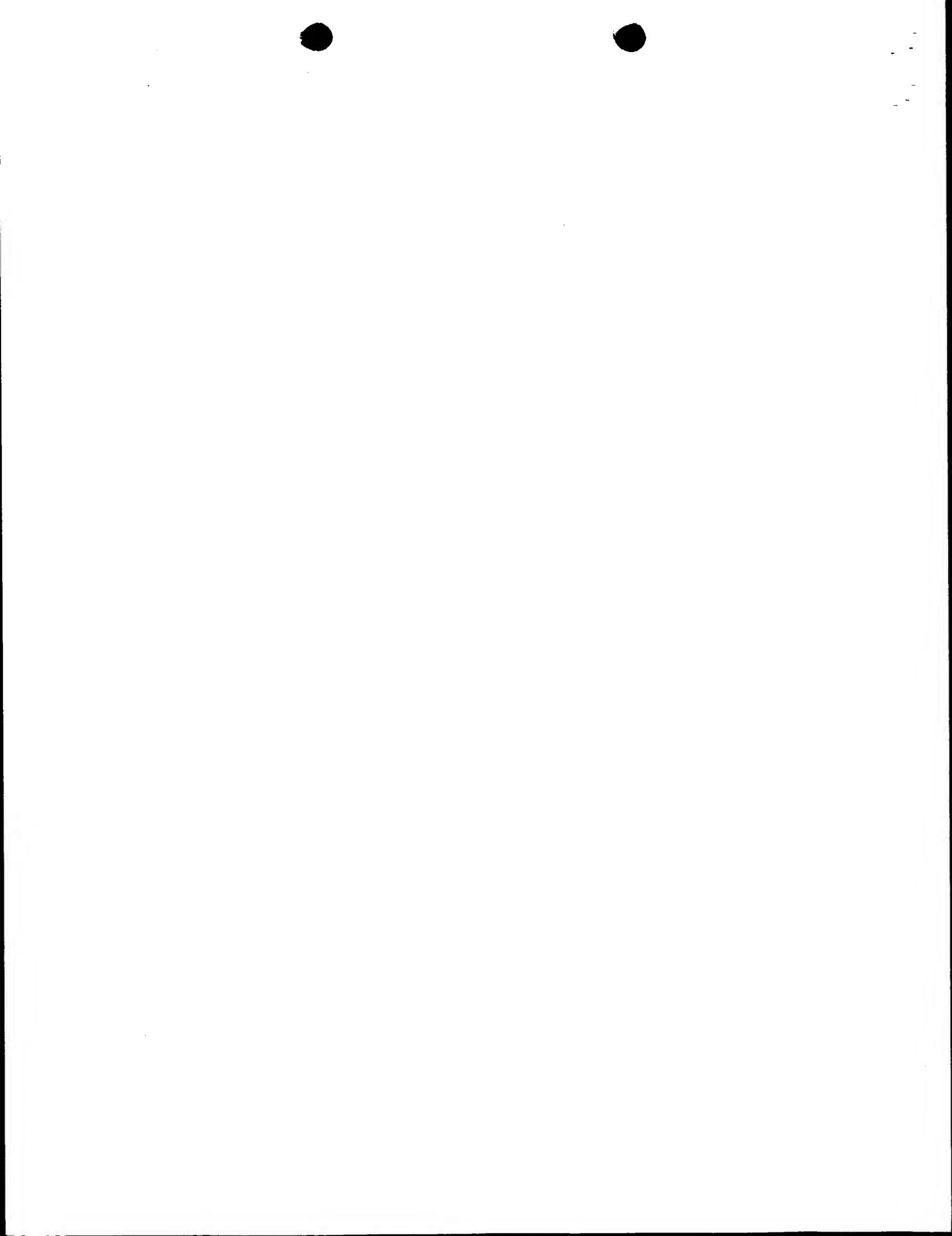
Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

**REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))**

If the applicant wishes to proceed with the international application in the **national phase**, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/05864

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/53, C12N9/02, C12N15/63, C12N1/21, C12Q1/26

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/53, C12N9/02, C12N15/63, C12N1/21, C12Q1/26

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
BIOSIS (DIALOG), JICST File (JOIS), GeneBank/EMBL/DDBJ (GENETYX)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, 7-203995, A (Toa Electronics Ltd.), 8 August, 1995 (08. 08. 95), Full text ; Fig. 1 (Family: none)	1, 6-13
Y	JP, 6-504200, A (Amersham International PLC), 19 May, 1994 (19. 05. 94), Full text ; Figs. 1 to 20 & WO, 92/12253, A1 & EP, 566625, A1 & US, 5558986, A	1, 6-13
Y	W.J. Simpson et al., "The Effect of Detergents on Firefly Luciferase Reactions", Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence, Vol. 6(2), 1991, p.97-106	1, 6-13
Y	JP, 5-244942, A (Kikkoman Corp.), 24 September, 1993 (24. 09. 93), Full text ; Figs. 1, 2 & EP, 524448, A1 & US, 5229285, A	1, 6-13

 Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

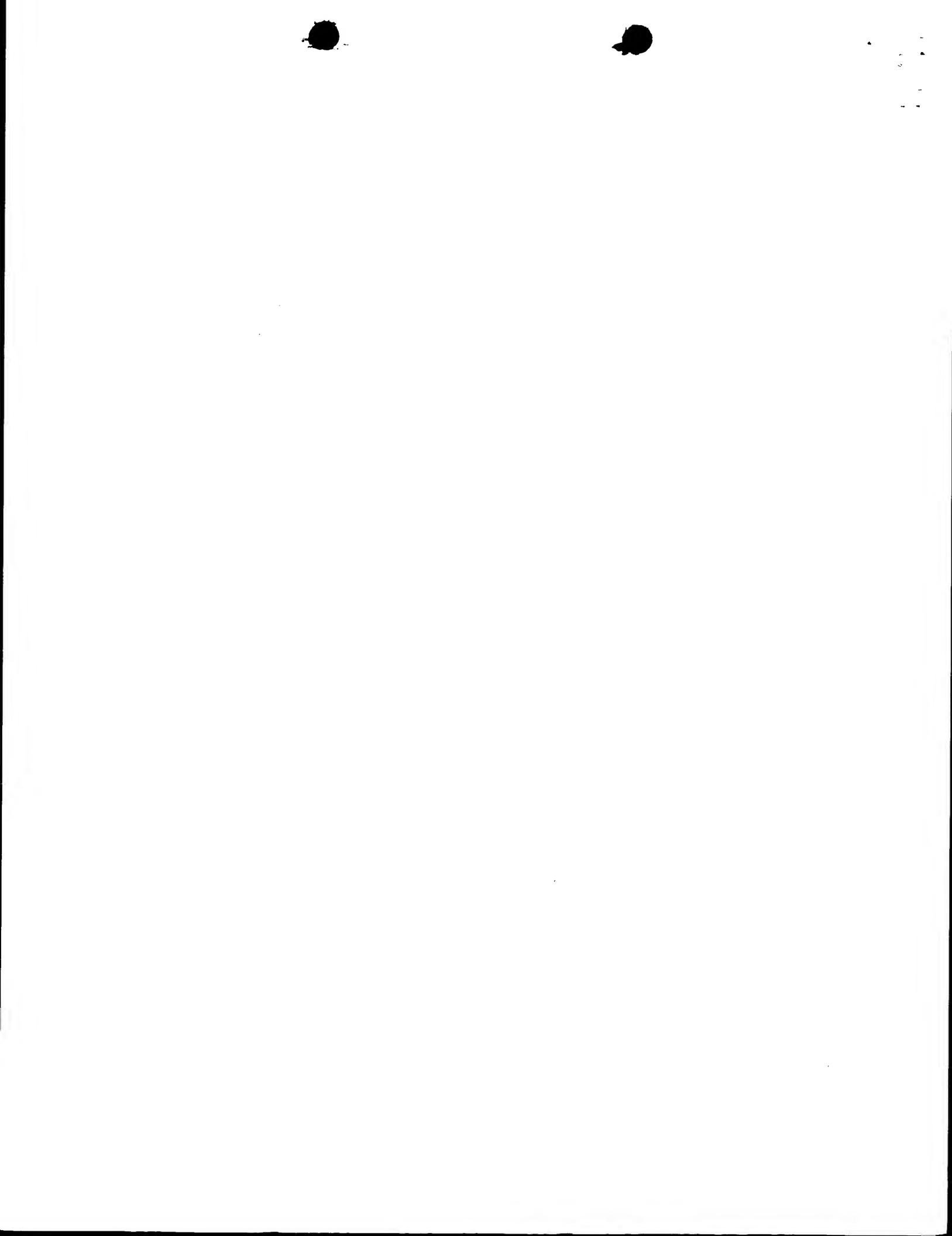
* Special categories of cited documents:	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&"	document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search  
17 March, 1999 (17. 03. 99)Date of mailing of the international search report  
30 March, 1999 (30. 03. 99)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



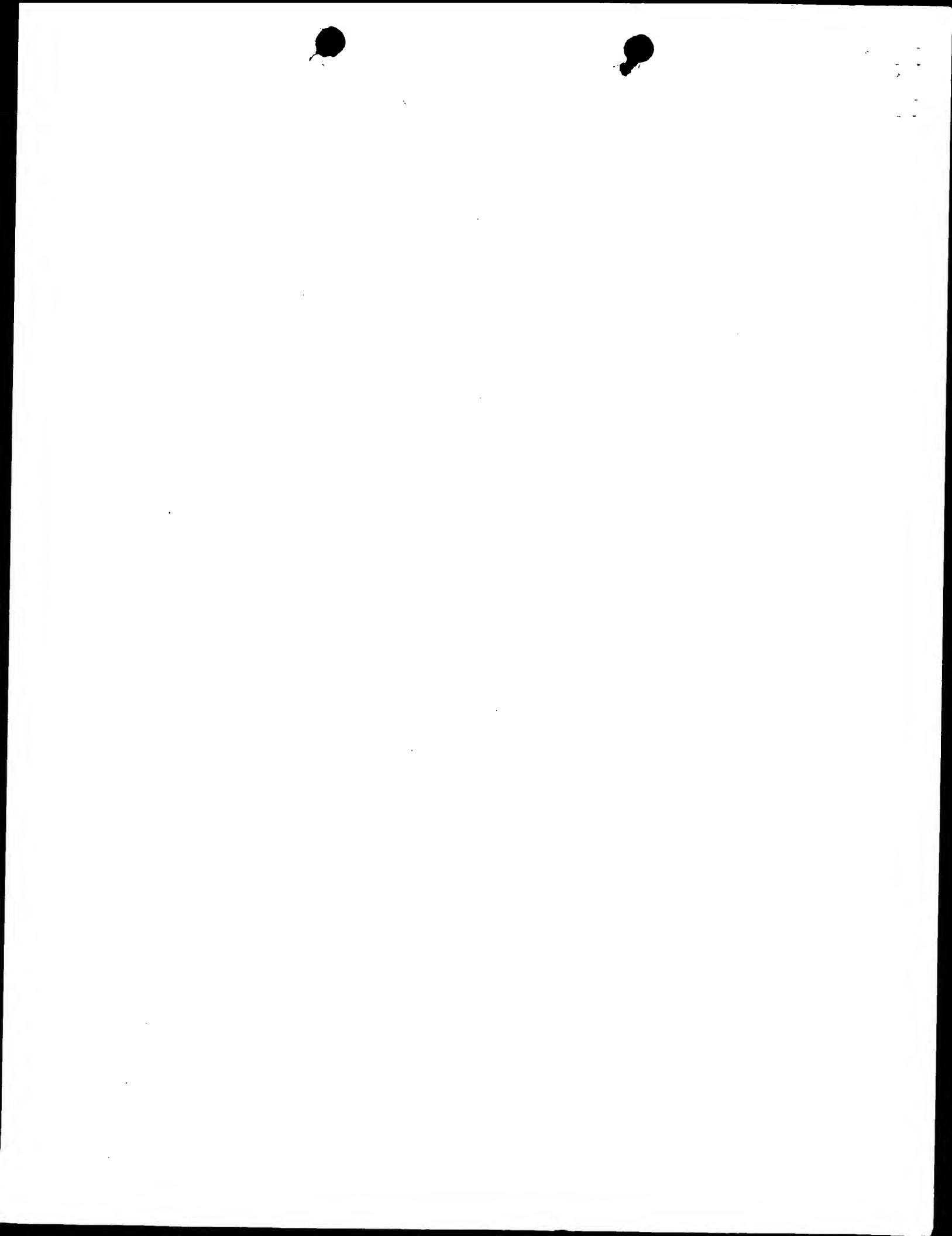
## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/05864

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 2-171189, A (Kikkoman Corp.), 2 July, 1990 (02. 07. 90), Full text ; Figs. 1 to 8 & EP, 353464, B1	1-9
A	Hiroki Tatsumi et al., "Molecular Cloning and Expression in Escherichia Coli of a cDNA Clone Encoding Luciferase of a Firefly, Luciola Lateralis",	1-9
A	Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 1131, 1992, p.161-165	1-9
A	Tsutomu Masuda et al., "Cloning and Sequence Analysis of cDNA for Luciferase of a Japanese Firefly, Luciola Cruciata", Gene, Vol. 77, 1988, p.265-270	1-9



5  
T

09/581241

## 特許協力条約

PCT

## 国際予備審査報告

REC'D 03 MAR 2000

WIPO

PCT

(法第12条、法施行規則第56条)  
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 PH-595-PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP98/05864	国際出願日 (日.月.年) 24.12.98	優先日 (日.月.年) 26.12.97
国際特許分類 (IPC) Int. Cl' C12N 15/53, C12N 9/02, C12N 15/63, C12N 1/21, C12Q 1/26		
出願人（氏名又は名称） キッコーマン株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。

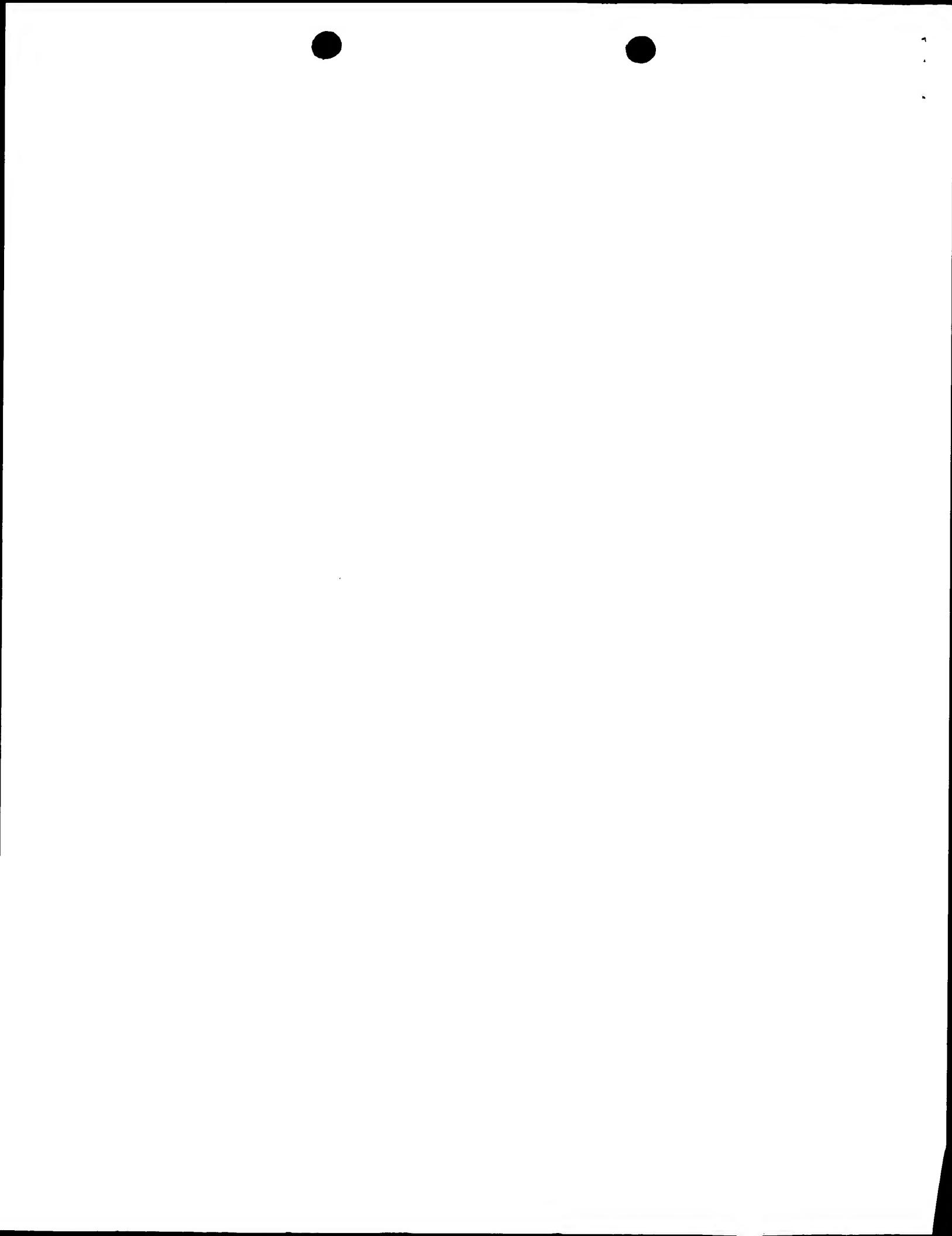
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。

この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対して訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で        ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I  国際予備審査報告の基礎
- II  優先権
- III  新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV  発明の単一性の欠如
- V  PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI  ある種の引用文献
- VII  国際出願の不備
- VIII  国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 28.05.99	国際予備審査報告を作成した日 21.02.00
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 深草 亜子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448
	4B 9548



## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。（法第6条（PCT14条）の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。PCT規則70.16, 70.17）

 出願時の国際出願書類

<input type="checkbox"/> 明細書	第 _____	ページ、	出願時に提出されたもの
明細書	第 _____	ページ、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書	第 _____	ページ、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲	第 _____	項、	出願時に提出されたもの
請求の範囲	第 _____	項、	PCT19条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲	第 _____	項、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲	第 _____	項、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 図面	第 _____	ページ/図、	出願時に提出されたもの
図面	第 _____	ページ/図、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面	第 _____	ページ/図、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分	第 _____	ページ、	出願時に提出されたもの
明細書の配列表の部分	第 _____	ページ、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書の配列表の部分	第 _____	ページ、	付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
- PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
- 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

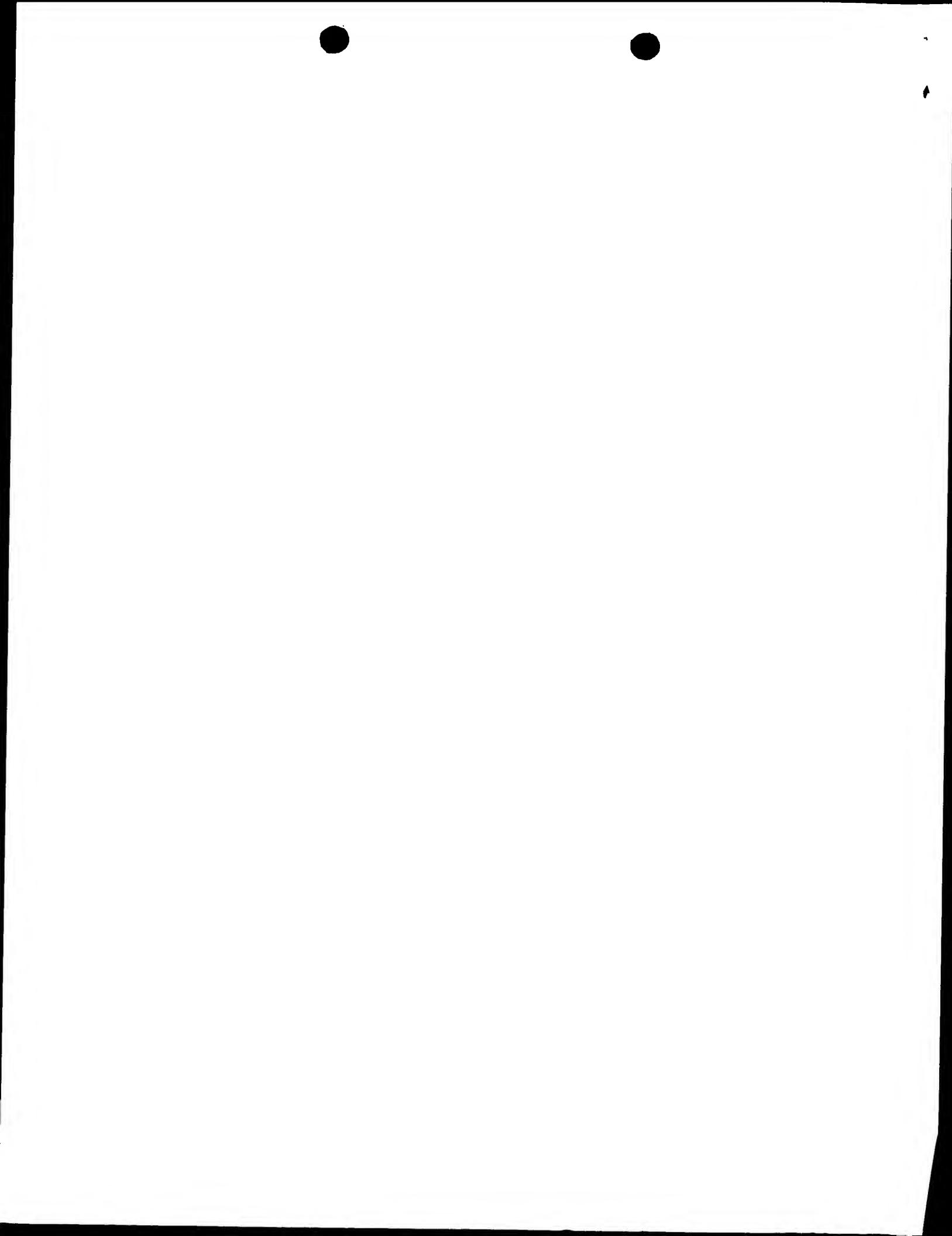
3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- この国際出願に含まれる書面による配列表
- この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出された書面による配列表
- 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
- 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ
- 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項
- 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5.  この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかつたものとして作成した。（PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。）



## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条 (PCT35条(2)) に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性 (N) 請求の範囲 1-13 有  
                  請求の範囲 \_\_\_\_\_ 無

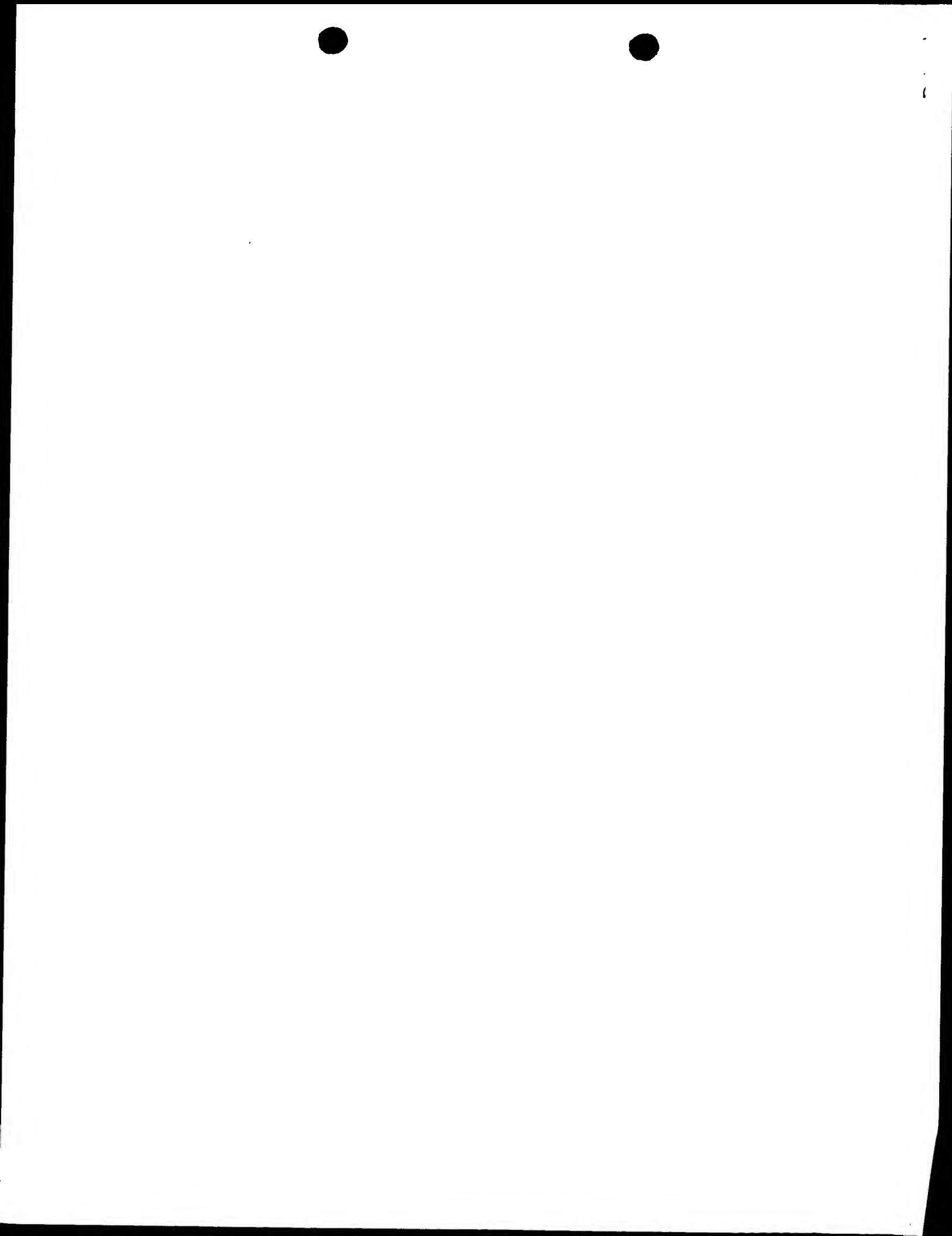
進歩性 (I S) 請求の範囲 2-5 有  
                  請求の範囲 1, 6-13 無

産業上の利用可能性 (I A) 請求の範囲 1-13 有  
                  請求の範囲 \_\_\_\_\_ 無

## 2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

請求の範囲1、6-13は、国際調査報告で引用した文献1 (JP, 7-203995, A (東亜電波工業株式会社) 8.8月. 1995 (08.08.95) (ファミリーなし))、文献2 (JP, 6-504200, A (アマーシャム・インターナショナル・ビーエルシー) 19.5月. 1994 (19.05.94) & WO, 92/12253 & EP, 566625, A1 & US, 5558986, A)、文献3 (W. J. Simpson et al. "The effect of Detergents on Firefly Luciferase Reactions" Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence Vol.6(2), 1991, p.97-106) 及び文献4 (JP, 5-244942, A (キッコーマン株式会社) 24.9月. 1993 (24.09.93) & EP, 524448, A1 & US, 5229285, A)により、進歩性を有しない。文献4には、耐熱性を有する変異ルシフェラーゼを作製することが記載されている。文献1-3には、ルシフェラーゼの活性が界面活性剤により低下するという課題が記載されているから、文献4記載のようにして界面活性剤耐性の変異ルシフェラーゼを作製することは、当業者にとって容易である。

さらに周知の遺伝子工学的技術を適用して組換えベクターや形質転換体を作製し、組換えルシフェラーゼを製造することも当業者が適宜なし得ることである。



E P

U S

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 PH-595-PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。		
国際出願番号 PCT/JP98/05864	国際出願日 (日.月.年)	24.12.98	優先日 (日.月.年)
出願人(氏名又は名称) キッコーマン株式会社			

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。  
 この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。  
 この国際出願に含まれる書面による配列表  
 この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表  
 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。  
 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2.  請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3.  発明の單一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は  出願人が提出したものを承認する。

次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は

出願人が提出したものを承認する。

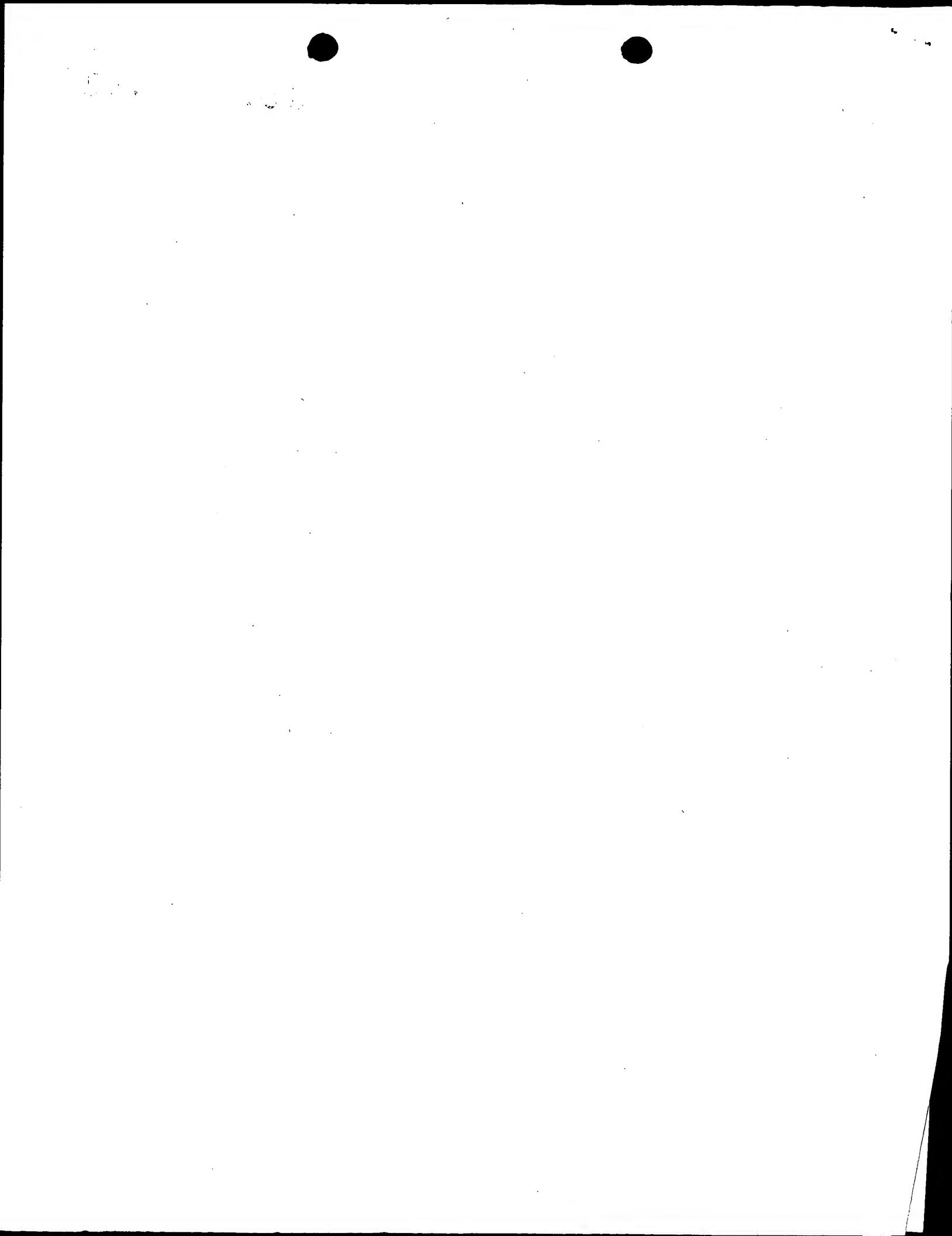
第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1ヶ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、  
第\_\_\_\_\_図とする。  出願人が示したとおりである。

なし

出願人は図を示さなかった。

本図は発明の特徴を一層よく表している。



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1° C12N15/53, C12N9/02, C12N15/63, C12N1/21,  
C12Q1/26

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1° C12N15/53, C12N9/02, C12N15/63, C12N1/21,  
C12Q1/26

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG)、JICSTファイル (JOIS)、GeneBank/EMBL/DDBJ  
(GENETYX)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 7-203995, A (東亜電波工業株式会社), 8. 8月. 1995 (08. 08. 95) 全文、第1図 (ファミリーなし)	1, 6-13
Y	JP, 6-504200, A (アマーシャム・インターナショナル・ビーエル シー), 19. 5月. 1994 (19. 05. 94) 全文、第1- 20図 & WO, 92/12253, A1 & EP, 566625, A1 & US, 5558986, A	1, 6-13
Y	W. J. Simpson et al., "The Effect of Detergents on Firefly Luciferase Reactions", Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence, Vol. 6(2), 1991, p. 97-106	1, 6-13
Y	JP, 5-244942, A (キッコーマン株式会社), 24. 9月. 1993 (24. 09. 93) 全文、第1-2図 & EP, 524448, A1 & US, 5229285, A	1, 6-13

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示す  
もの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日  
以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行  
日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する  
文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって  
て出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理  
論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明  
の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以  
上の文献との、当業者にとって自明である組合せに  
よって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 03. 99

国際調査報告の発送日

30.03.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

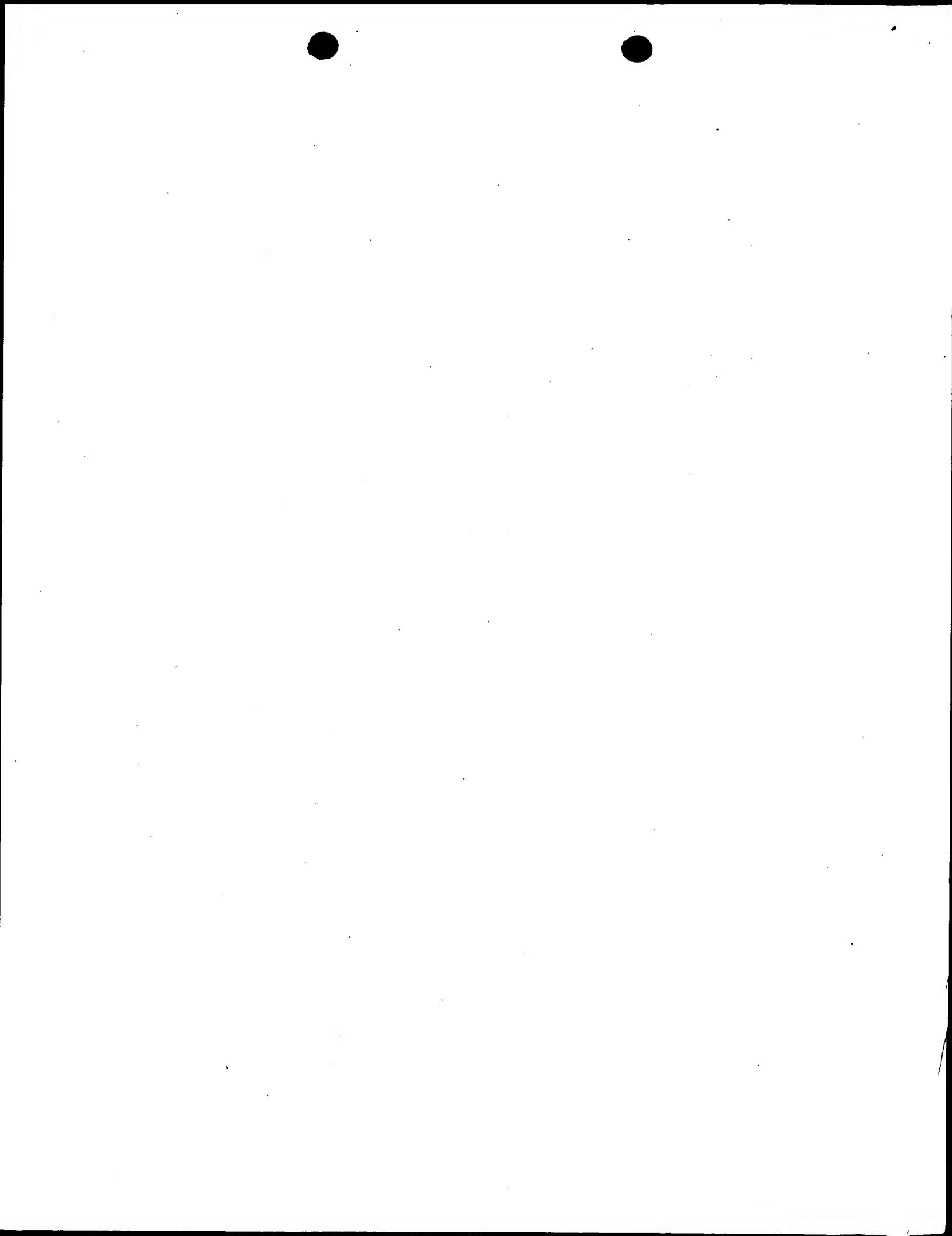
富士 良宏

印

4B

8830

電話番号 03-3581-1101 内線 3449



C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	JP, 2-171189, A (キッコーマン株式会社), 2. 7月.1990 (02.07.90) 全文、第1-8図 & EP, 353464, B1	1-9
A	Hiroki Tatsumi et al., "Molecular Cloning and Expression in Escherichia Coli of a cDNA Clone Encoding Luciferase of a Firefly, <i>Luciola Lateralis</i> ", <i>Biochimica et Biophysica Acta</i> , Vol. 1131, 1992, p. 161-165	1-9
A	Tsutomu Masuda et al., "Cloning and Sequence Analysis of cDNA for Luciferase of a Japanese Firefly, <i>Luciola Crucifera</i> ", <i>Gene</i> , Vol. 77, 1988, p. 265-270	1-9

